Der Nachweis von Antikörpern gegen Staphylokokken-Enterotoxin B mittels Agar-Gel-Präzipitation, ELISA und RIA nach parenteraler und aerogener Immunisierung von Kaninchen

Therese Einöder

1979

Aus der Akademie
des Sanitäts- und Gesundheitswesens
der Bundeswehr
Fachgebiet Mikrobiologie

vorgelegt über

das Institut für Hygiene und Technologie
der Lebensmittel tierischen Ursprungs
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
(Lehrstuhl: Professor Dr.G.Terplan)

Der Nachweis von Antikörpern gegen Staphylokokken-Enterotoxin B mittels Agar-Gel-Präzipitation, ELISA und RIA nach parenteraler und aerogener Immunisierung von Kaninchen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Therese Einöder
aus
Regensburg

München 1979

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät

der Universität München

Dekan: Prof. Dr. H. Kräußlich

Referent: Prof. Dr. G. Terplan

Korreferent: Prof. Dr. D.O. Schmidt

Tag der Promotion: 27. Juli 1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Meinen Eltern

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551913_0069

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	1
2.	Literatur	2
2.1	Staphylokokken-Enterotoxin	2
2.1.1	Vorkommen	2
2.1.2	Chemische Eigenschaften	2
2.2	Immunreaktion gegen körperfremdes Protein	3
2.2.1	Zelluläre Immunreaktion	3
2.2.2	Humorale Immunreaktion	5
2.2.3	Serologische Unterschiede der Antikörper	7
2.3	Immunisierungsmethoden	8
2.3.1	Parenterale Immunisierung	9
2.3.2	Aerogene Immunisierung	9
2.3.2.1	Begriffsdefinition und Anwendung des Aerosols	9
2.3.2.2	Erzeugung von Aerosolen	10
2.3.2.3	Bestimmung der inhalierten Aerosolmenge	11
2.3.2.4	Einfluß der Physiologie des Respirationstraktes auf die Antigenaufnahme	13
2.3.2.5	Reaktion der Atemwege auf eingedrungenes Antigen	16
2.3.2.5.1	Unspezifische Abwehrreaktionen	17
2.3.2.5.2	Spezifische Abwehrreaktionen	17
2.4	Beeinflussung des weißen Blutbildes nach Infektion bzw. Immunisierung	21
2.4.1	Normalwerte und Bedeutung verschiedener Zelltypen	22
2.4.2	Pathologisch verändertes weißes Blutbild	23

Seite

2.5	Serologische Methoden zum Antikörpernachweis	25
2.5.1	Gel-Präzipitationsreaktionen	25
2.5.2	Nachweisverfahren für sehr kleine Antigen- bzw. Antikörpermengen	25
2.5.2.1	Radioimmunoassay	26
2.5.2.2	Enzyme-linked immunosorbent assay	29
3	Eigene Versuche	31
3.1	Material	31
3.1.1	Staphylokokken-Enterotoxin B zur Immunisierung	31
3.1.2	Referenzsera	31
3.1.3	Versuchstiere	31
3.1.4	Geräte zur Aerosolerzeugung	32
3.1.5	Tabellarische Material- und Reagenzienaufstellung	33
3.2	Methode	36
3.2.1	Immunisierung	36
3.2.1.1	Parenterale Immunisierung der Versuchstiere	36
3.2.1.2	Aerogene Immunisierung	37
3.2.2	Blutuntersuchungen	39
3.2.2.1	Vorbereitung für das Differentialblutbild	39
3.2.2.2	Bestimmung der Gesamt-Leukozytenzahl	39
3.2.2.3	Serumgewinnung	39
3.2.3	Herstellung von Gammaglobulin und Messen des Proteingehalts	40
3.2.4	Serologischer Nachweis von Anti-Staphylokokken-Enterotoxin B-Serum	41
3.2.4.1	Agar-Gel-Präzipitationstest	41
3.2.4.2	Radioimmunoassay	42
3.2.4.3	Enzyme-linked immunosorbent assay	44

Seite

4.	Ergebnisse	47
4.1	Auswertung der Blutuntersuchungen	47
4.1.1	Beurteilung der Gesamt-Leukozytenzahl	47
4.1.2	Beurteilung des Differentialblutbildes	47
4.2	Ergebnisse aus den serologischen Nachweismethoden von Anti-Staphylokokken-Enterotoxin B-Serum	50
4.2.1	Agar-Gel-Präzipitationstest	50
4.2.1.1	Auswertung der Antikörperwerte nach parenteraler Applikation	52
4.2.1.2	Auswertung der Antikörperwerte nach aerogener Applikation	52
4.2.2	Enzyme-linked immunosorbent assay	54
4.2.2.1	Nachweis der Antikörper nach parenteraler Immunisierung	54
4.2.2.2	Nachweis der Antikörper nach aerogener Immunisierung	56
4.2.3	Radioimmunoassay	58
4.2.3.1	Auswertung der Antikörper nach parenteraler Immunisierung	58
4.2.3.2	Beurteilung der Antikörperwerte nach aerogener Immunisierung	60
5.	Diskussion	64
6.	Zusammenfassung	72
7.	Summary	75
8.	Literaturverzeichnis	78

1. Einleitung

Im Hinblick auf prophylaktische und therapeutische Maßnahmen gegen Lebensmittelintoxikationen ist es notwendig, deren Kausalität zu eruieren. Dies ist um so mehr erforderlich, als durch die ständig wachsende Lebensmittelversorgung über Großküchen das Risiko durch den Verzehr gesundheitsschädlicher Lebensmittel immer größere Personenkreise betrifft. Neben Salmonellen sind in steigender Zahl auch Staphylokokken an 'Lebensmittelvergiftungen' beteiligt (24).

Die Diagnostik der von Staphylokokken gebildeten Enterotoxine hat sich in den letzten Jahren vom aufwendigen Tierversuch und biologischen Nachweis zu einer weit entwickelten Serodiagnostik verlagert. Die dafür notwendigen Antitoxine müssen streng spezifisch sein und einen hohen Antikörpergehalt aufweisen, um der erforderlichen Empfindlichkeit dieser Verfahren gerecht zu werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war, die parenterale und aerogene Antigenapplikation im Hinblick auf die Antikörperbildung beim Kaninchen zu vergleichen; dabei sollte auch der Einfluß dieser beiden Immunisierungsarten auf den Antikörpernachweis mit verschiedenen Methoden berücksichtigt werden.

2. Literatur

2.1 Staphylokokken-Enterotoxin (SE)

2.1.1 Vorkommen

Bei der 'Lebensmittelvergiftung', die durch Staphylococcus aureus verursacht wird, handelt es sich um eine reine Intoxikation, die durch Toxine hervorgerufen wird, die bei Vermehrung dieser Keime im betreffenden Lebensmittel gebildet werden. In vitro läßt sich dieses Stoffwechselprodukt der Staphylokokken durch Züchten der Bakterien in speziellen Nährmedien gewinnen. Nach serologischer Spezifität werden bis heute 6 Enterotoxin-Typen (A-F) unterschieden.
Am leichtesten ist die Gewinnung von Staphylokokken-Enterotoxin B (SEB).
Von 80 untersuchten Stämmen tritt Enterotoxin A mit 49 % am häufigsten auf, gefolgt von Enterotoxin D mit 25 %, Enterotoxin C mit 7,6 % und Enterotoxin B mit 3,8 % (24). Über die prozentuale Beteiligung von Enterotoxin E und F liegen keine genauen Angaben vor.

2.1.2 Chemische Eigenschaften

Diese Toxine sind wasserlösliche und weitgehend thermostabile Proteine mit einem Molekulargewicht von 27800-34100 (47).
SEB besteht aus einer einzigen Polypeptidkette, die aus 239 Aminosäureresten aufgebaut ist, mit relativ hohem Gehalt an Lysin, Asparaginsäure, Glutaminsäure

und Tyrosin. Nahe der Kettenmitte verbindet eine Disulfidbrücke zwei Cystein-Reste, wodurch sich das Molekül als Aminosäureschlinge darstellt (7).
Auf Grund ihrer Eiweißnatur sind diese Toxine in der Lage, die Antikörperbildung zu induzieren.

2.2 Immunreaktion gegen körperfremdes Protein

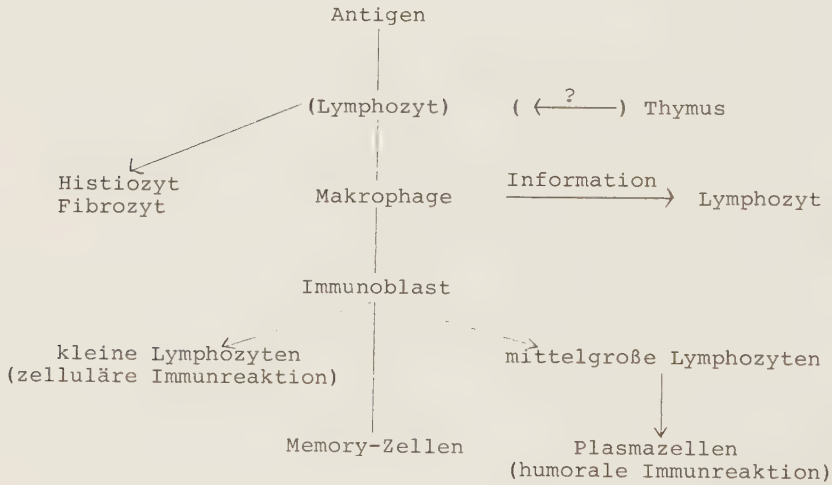
Wird ein Organismus mit körperfremden Substanzen konfrontiert, sei es peroral, parenteral oder aerogen, so werden Abwehrreaktionen induziert, um dieses Antigen zu eliminieren. Man unterscheidet dabei spezifische und unspezifische Immunreaktionen.
Erstere werden durch das Antigen selbst ausgelöst, letztere sind Begleiterscheinungen oder sekundäre Folgen der spezifischen Immunantwort (71).
Die Differenzierung zwischen körpereigenen und körperfremden Stoffen geschieht nach BURNET (10) wahrscheinlich durch Thymozyten, die während ihrer immunologischen Reifezeit diese Fähigkeit erlernen.

2.2.1 Zelluläre Immunreaktion

Für die Ausbildung von Antikörpern interessiert im Rahmen dieser Arbeit die spezifische Immunantwort, die sich wiederum in zwei Teile gliedern läßt (71): In die zelluläre Reaktion und die Sofortreaktion.
Bei der Sofortreaktion übernehmen Proteine - humorale Antikörper - die Abwehrfunktion (71).
Der mögliche Entstehungsmechanismus immunologisch kompetenter Zellen geht aus Abb. 1 hervor.

Abb. 1

Möglicher Entstehungsmechanismus immunologisch kompetenter Zellen (UHLENBRUCK, 71)



Undifferenzierte, antigenreaktive Lymphozyten gehen aus dem Reservoir undifferenzierter Stammzellen hervor, die sowohl im fetalen als auch im adulten Organismus vorhanden sind.
Der funktionellen Reifung der Stammzellen aus dem Knochenmark zu B- und T-Lymphozyten in Thymus und Bursaäquivalent folgt die abschließende Differenzierung in den peripheren lymphatischen Organen - Milz, Lymphknoten, Peyer'sche Platten, Tonsillen, Blut. Die ausgereiften Lymphozyten sind reaktiv gegen alle Antigene (58).

Ein Unterschied zwischen beiden Zelltypen liegt darin, daß die T-Zellen im lymphatischen System mobil sind, während die B-Zellen ortsständig sind und durch Immunglobuline auf ihrer Oberfläche die Vorstufe für antikörperproduzierende Zellen darstellen. Die Sensibilisierung der Lymphozyten auf eingedrungenes Antigen erreicht 8-14 Tage nach dem Primärkontakt ihren Höhepunkt; im Falle der Allergie vom verzögerten Typ tritt bei Boosterung die Immunreaktion bereits nach 6-24 Stunden auf und ist nach 24-48 Stunden voll ausgeprägt (58).

2.2.2 Humorale Immunreaktion

Bei der humoralen Abwehr werden nach Eindringen eines Antigens von den Plasmazellen Antikörper sezerniert. Diese reagieren mit dem Antigen unter Bildung des Antigen-Antikörper-Komplexes. Die humoralen Antikörper sind Glycoproteine, die aus mehreren Polypeptidketten,
den langen Schwerketten - Heavy-chains - und
den kurzen Leichtketten - Light-chains -
aufgebaut sind.
Zwei identische Schwer- und zwei identische Leichtketten sind über Disulfidbrücken und nicht kovalente Bindungen zu einem Immunglobulinmolekül verbunden (41).

Enzymatisch läßt sich das Molekül in drei Teile zerlegen: Zwei identische bestehen aus einer L- und einem Teil einer H-Kette und haben die Eigenschaft, sich mit einer Antigendeterminanten zu verbinden. Diese Fragmente werden als Fab-Teil (Fragment antigen bindung) bezeichnet. Der dritte als Fc (crystallizable) bezeichnete Teil wird durch Auskristallisierung mit Papain abgespalten und besteht aus den beiden Resten der H-Ketten; er stellt die Verbindung zu den Rezeptoren der Target-Zellen her.

Weitere Funktionsbereiche des Antikörpermoleküls konnten durch die Bestimmung der Sequenz innerhalb der Aminosäurenkette der H- und L-Ketten festgestellt werden.
Die Unterschiede sind in den N-terminalen Hälften der Aminosäurenkette lokalisiert, während die C-terminalen Hälften verschiedener Antikörper nahezu identisch sind.
Demzufolge wird bei den H- und L-Ketten ein variabler (V) und ein konstanter (C) Bereich differenziert (41).

Aufgrund ihrer Unterschiede im C-Teil der H-Ketten werden die Antikörper beim Menschen in fünf Klassen eingeteilt: IgG-Antikörper treten vorwiegend im Serum auf und sind in ihrer Struktur hochspezifisch auf das Antigen abgestimmt; IgA-Antikörper stellen den Hauptanteil der Antikörper in den Sekreten exokriner Drüsen (z.B. Speichel, Milch) und sind relativ wenig an die Antigene angepaßt; IgM-Antikörper scheinen in der ersten Phase der Immunantwort eine wesentliche Rolle zu spielen; IgD-Antikörper findet man mit IgM-Antikörper auf der Oberfläche von B-Lymphozyten als Antigenrezeptoren; IgE-Antikörper, auch als 'Reagine' bezeichnet, sind für anaphylaktische Reaktionen verantwortlich (41).

Der zeitliche Ablauf der humoralen Immunantwort auf Antigen-Kontakt erfolgt in mehreren Phasen. Einer ca. zweitägigen Latenzphase folgt ein exponentieller Anstieg des Antikörpertiters, den eine stationäre Phase ablöst, in der der Antikörpertiter nur langsam absinkt.

2.2.3 Serologische Unterschiede der Antikörper

Bei den Antikörpern wird generell zwischen kompletten (bivalenten) und inkompletten (univalenten) unterschieden. Letzteren, auch als blockierende Antikörper bezeichnet, fehlen verschiedene serologische Reaktionen, die man normalerweise erwarten müßte (58).
Dieses 'inkomplette' Verhalten ist entweder auf den Antikörper selbst oder auf topochemische Anordnungen im Antigen zurückzuführen. Diese Antikörper sind univalent und damit unfähig zu präzipitieren. Durch die eine funktionsfähige haptophore Gruppe sind sie in der Lage, sich mit einer haptophoren Gruppe des Antigens zu verbinden und können damit eine sichtbare Präzipitation verhindern (52, 67).

Im Gegensatz dazu stehen die kompletten Antikörper, die aufgrund ihrer Bivalenz mit homologen Antigenen umfangreiche Immunkomplexe bilden können. Durch bivalente Antikörper werden zwei, meist plurivalente Antigene spezifisch gebunden, deren freie Determinanten weitere bivalente Antikörper besetzen können.
Man unterscheidet dabei
- präzipitierende,
- agglutinierende,
- neutralisierende,
- komplementbindende,
- hämagglutionationshemmende Antikörper (60).

Da in der vorliegenden Arbeit weder Agglutinationsreaktionen noch Komplementbindungsreaktionen, noch der Hämagglutinationshemmungstest zum Nachweis der korrespondierenden Antikörper verwendet wurden, wird hier auf die Darstellung dieser Antikörper verzichtet.

Auf Grund der immunologischen Eigenschaften sind alle Antikörper zur Präzipitation befähigt. Die einzige Voraussetzung dafür ist Polyvalenz von Antikörper und Antigen. Beim Zusammentreffen löslicher Antikörper und Antigene gibt es einen unlöslichen Niederschlag, der durch Ausbildung einer Netzstruktur zwischen beiden Reaktionspartnern zustandekommt (64, 41).

2.3 Immunisierungsmethoden

Die unter 2.2 beschriebenen Immunantworten beziehen sich auf Reaktionen mit einem Antigen, das auf parenteralem Weg, dem für die Immunisierung üblichen, in den Organismus gelangt.
Neuerdings gewinnt die lokale Applikation - oral, über Wunden, aerogen - immer mehr an Bedeutung, da sie eine Reihe von Vorteilen gegenüber der parenteralen Methode bietet, wie z.B.:
schnellerer Impfschutz, geringere allgemeine Impfreaktionen, Verhinderung subklinischer Infektionen.
Der Begriff der lokalen Immunisierung stammt aus der Zeit, als man annahm, daß sich im Anschluß daran eine lokale, genau begrenzte Immunität in dem mit dem Antigen kontaminierten Gewebe ausbilde.
Mittlerweile erkannte man, daß sich bei geeigneter Applikation eine Immunität des gesamten Organismus erzeugen läßt (54).

In der vorliegenden Arbeit sollten die Immunreaktionen auf parenterale und aerogene Immunisierung miteinander verglichen werden.

2.3.1 Parenterale Immunisierung

Ein großer Teil der Antigene, die als Impfstoffe oder zur Sensibilisierung verwendet werden, wird parenteral, d.h. unter Umgehung des Gastro-Enteral-Trakts mit seinen Verdauungsenzymen, appliziert.
Die Methode der Wahl ist dafür intramuskuläre oder subkutane Injektion, die sowohl für Lebend- als auch für Totimpfstoffe Anwendung findet.
Als Ausnahmen gelten die Impfung gegen Poliomyelitis mit Lebendimpfstoff und gegen Typhus mit Totimpfstoff. Beide sind Beispiele für eine enterale Impfung.

2.3.2 Aerogene Immunisierung

2.3.2.1 Begriffsdefinition und Anwendung des Aerosols

Der Begriff des 'Aerosol' stammt aus der Kolloidchemie und wird für die Dispersionsform fester oder flüssiger Partikel in Gas verwendet. Soll das Aerosol zur Inhalation von Antigenen für die Erzeugung einer Immunantwort verwendet werden, so muß der gasförmige Träger atembare Luft sein (14).
Die in diesem Medium dispergierten Teilchen oder Partikel müssen schwebefähig sein. Das setzt voraus, daß sie nicht schwerer als 10^{-9}g sein dürfen. Daraus ergibt sich auch der Durchmesser < 5 µm.
Größere und schwerere, nicht schwebefähige Teilchen, die über die Atemwege appliziert werden können, (Größe > 5 µm, Gewicht $> 10^{-9}$g) werden als Spray bezeichnet (55).

2.3.2.2 Erzeugung von Aerosolen

Neben den natürlich vorkommenden Aerosolen, die Pilzsporen, Bakterien oder Viren enthalten können, gibt es künstliche Aerosole, die durch zwei Grundarten erzeugt werden können:

a) im Atomizerverfahren und

b) durch Ultraschallvernebelung.

ad a)

Es handelt sich hierbei um die gebräuchlichste und älteste Methode zur Aerosolerzeugung.
Die zu vernebelnde Flüssigkeit wird von komprimierter Luft (1,5 atü) durchströmt, in der Zerstäuberdüse werden Flüssigkeitsteilchen mitgerissen. Nach Entspannung auf atmosphärischen Druck entsteht der Primärnebel, d.h. Teilchen verschiedener Größe. Durch Prallwände und das Umlenken des Nebels werden die unbrauchbaren größeren Teilchen abgeschieden und die schwebefähigen Teilchen können als Sekundärnebel den Atomizer verlassen.

ad b)

Einem piezokeramischen Schwinger wird hochfrequenter Strom zugeführt, wobei die elektrische Energie in mechanische Schwingungen umgewandelt wird. Diese werden direkt auf die zu vernebelnde Flüssigkeit oder über eine Kopplungsflüssigkeit übertragen. Dabei entsteht ein Schallstrahl, der an der Grenzfläche zur Luft hin einen Sprudel erzeugt. Ab einer kritischen Ausstrahlungsenergie löst sich der Sprudel auf und es entsteht ein feiner Nebel. Durch die hochfrequente Ultraschallschwingung können chemische Verbindungen aufgebrochen werden, wodurch diese Art der Vernebelung für bakterielle Impfstoffe in Frage gestellt ist (63).

2.3.2.3 Bestimmung der inhalierten Aerosolmenge

Im Gegensatz zu den üblichen Applikationsarten ist es bei der Aerosolimmunisierung außerordentlich schwierig, festzustellen welche Menge des eingesetzten Antigen vom Versuchstier aufgenommen und retiniert wird.
Die inhalierte Menge unterliegt großen, individuellen Schwankungen, die durch Aerosolqualität und -quantität, Atemfrequenz, Atemvolumen und andere physiologische Parameter bestimmt sind.
In mathematischen Formeln, die die aufgenommene Menge annähernd kalkulieren, spielen diese Faktoren keine Rolle.
Davon ausgehend, daß alle Aerosolteilchen, die in die Atemwege eindringen, aktiv sind, und die eingeatmete Luftmenge bekannt ist, ist die Berechnung der Inhalationsdosis nach der Formel von BOLOTOVSKIJ (8) JEMSKI und PHILLIPS (34), DIMMICK und AKERS (13), FOURNIER (25)

$$D = C \cdot V \cdot T$$

D = Inhalationsdosis
C = Aerosolkonzentration
V = Atemminutenvolumen
T = Expositionszeit

Berechnung des Atemminutenvolumens

In der Literatur sind keine experimentell ermittelten Werte für das Atemminutenvolumen von Kaninchen verzeichnet, so daß es nach der Formel von GUYTON (29) berechnet werden muß, die auf das Atemminutenvolumen (AMV) aller Säugetiere anwendbar ist (29):

$$AMV = 2{,}10 \times g^{0{,}75}$$

g = Körpergewicht des Versuchstieres in Gramm

Tabelle 1

AMV für verschiedene Gewichte

(berechnet nach der Formel von GUYTON):

Gewicht	AMV
10 g	11,81 ml
20 g	19,85 ml
50 g	40,4 ml
100 g	66,4 ml
500 g	222,0 ml
1000 g	373,4 ml (0,4 l)
2000 g	627,9 ml (0,6 l)
3000 g	851,1 ml (0,85 l)
4000 g	1056,0 ml (1,0 l)
5000 g	1248,5 ml (1,2 l)
6000 g	1431,6 ml (1,4 l)
7000 g	1607,0 ml (1,6 l)
8000 g	1776,3 ml (1,8 l)

Retention des inhalierten Aerosols

Wieviel von der inhalierten Menge aber nun tatsächlich im Körper bleibt, ist weder durch diese Formeln noch anhand der Literatur zu klären.

Nach LECLERCQ (44) und FOURNIER (26) werden nur 1 - 4 % des angebotenen Aerosols inhaliert; SELIVANOV et al. (65) berechneten aus der Differenz zwischen inspirierter und exspirierter Luft, daß 18 bis 27 % der inhalierten Luft retiniert werden.

2.3.2.4 Einfluß der Physiologie des Respirationstraktes auf die Antigenaufnahme

Um Aerosolimmunisierungen sinnvoll einsetzen zu können, sind Physiologie und Funktionen der Atemwege und das Verhalten des Aerosols nach Inhalation zu berücksichtigen.
Nasenhöhlen,Nebenhöhlen, Trachea und Stammbronchien sind mit Flimmerepithel ausgekleidet, dessen Schlagrichtung zentral zum Pharynx geht; dazwischen befinden sich schleimproduzierende Becherzellen. Der Schleim wird als geschlossene Decke durch den Cilienschlag in Richtung Pharynx bewegt.
Die Wände des Gasaustauschsystems bestehen aus einer Schicht flacher Zellen mit Mikrovilli, die auf der Basalmembran das Endothel der Lungenkapillaren tragen. Im Alveolarlumen liegen Makrophagen, deren Herkunft umstritten ist.
Lymphbahnen sind erst von den Bronchioli respiratorii ab aufwärts nachweisbar. Die Lymphe aus dem Lungenbereich gelangt über die regionalen Lymphknoten in den Ductus thoracicus, von dort aus in die Vena brachiocephalica und das rechte Herz und damit in den Lungen- und Körperkreislauf.

Die Lokalisation der Antigenaufnahme im Respirationstrakt ist von der Teilchengröße der Flüssigkeitspartikel abhängig. Generell kann man sagen, daß sich Teilchen in einer Größe von mehr als 5 µm im Rhinopharynx, in der Trachea und den Bronchien niederschlagen, während kleinere Teilchen bis in die Bronchiolen und Lungenalveolen gelangen (30, 34).
Bei Partikeln kleiner als 0,2 µm tritt die Diffusion als Retentionsmechanismus in Kraft.

Für die Abscheidung der Antigenpartikel in den Atemwegen gibt es drei Erklärungen (30, 31, 48):

- Die mitgerissenen Aerosolteilchen stoßen infolge der Trägheit gegen das Atemwegsepithel der Nase und der tieferen Respirationsorgane und werden dort zurückgehalten.
- Durch Sedimentation fallen die größeren Partikel in den Atemwegen aus.
- In den Alveolen gewinnt die Brown'sche Molekularbewegung an Bedeutung, wodurch sich ein häufiger Aufprall und schnellerer Ausfall auf dem Epithel erklären läßt.

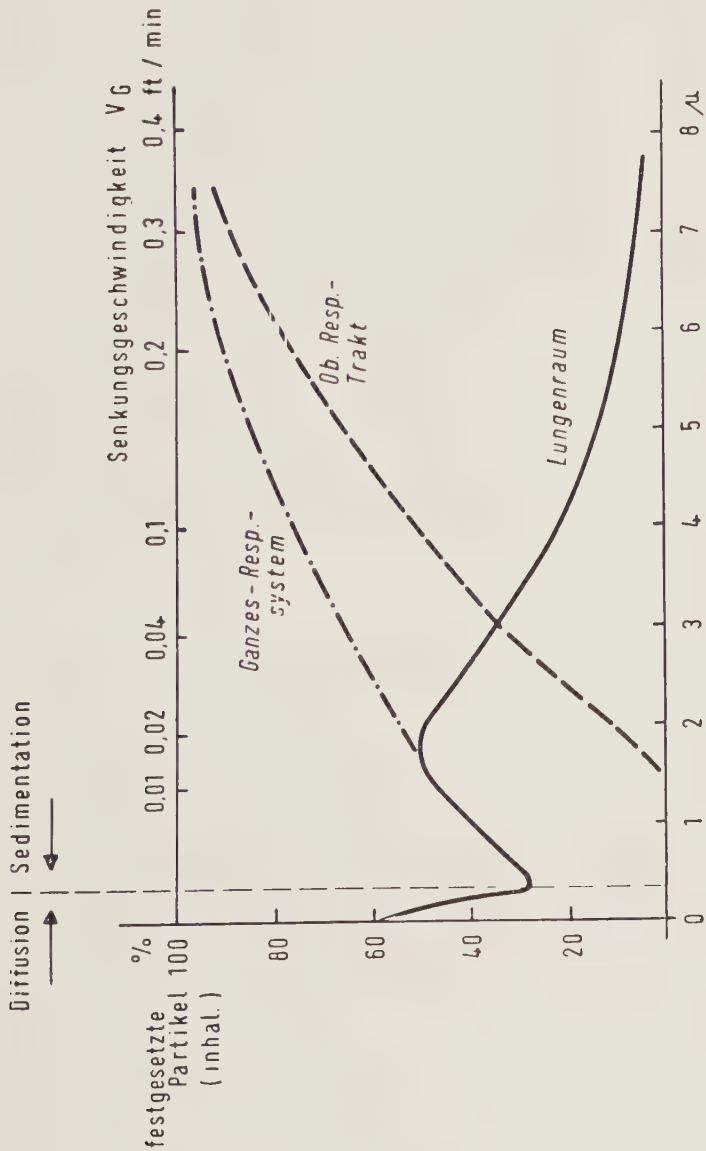
Partikel mit einer Größe von über 1 µm werden in den Bronchiolen phagozytiert. Teilchen, die sich auf dem Flimmerepithel niederschlagen, werden meist mit dem Schleimfilm über die Trachea zum Kehlkopf befördert und abgeschluckt (15).
VAN HOUT (74) führte Versuche mit Jod^{131} markiertem Ovalbumin durch, das Ratten als Flüssigkeitsaerosol verabreicht wurde. Unmittelbar nach der Inhalation wurde folgende Verteilung gemessen:

Mund- und Nasenhöhle	12,8	%
Trachea	0,56	%
Lungen	1,5	%
Ösophagus	2,1	%
Magen	81,0	%
Darm	1,46	%

Eine prozentuale Verteilung der eingeatmeten Partikel im Respirationstrakt ist auf nachfolgender Graphik abzulesen.

Abb. 2

Festsetzung inhalierter Partikel im Respirationstrakt (31)



Andererseits zeigten BUCKLAND et al.(9) in einem Versuch an Kaninchen, daß sich Partikel mit einem Durchmesser von 0,5 µm zu 51 % bis 58 % in den Alveolen niederschlagen. Für die Ablagerung der Teilchen ist nicht die Größe allein ausschlaggebend; andere Parameter, wie elektrostatische Ladung der Teilchen, Atemvolumen und Atemfrequenz beeinflussen die Effektivität der Aerosolbehandlung.

Als andere Aufnahme inhalierter Aerosolpartikel ist die lokale Retention in der Lunge zu erwähnen, die hauptsächlich bei festen Bestandteilen auftritt.

Eine weitere Möglichkeit stellt die Absorption im Ablagerungsbereich der Schleimhaut der Atemwege und die rasche Aufnahme nach innen dar, der eine regionäre und allgemeine Reaktion des Organismus folgt (25). ALEXANDROV (82) fand z.B. bei Kaninchen, die Typhus- und Ruhrbakterien eingeatmet hatten, diese in den Lymphknoten der Lungen, in Leber, Milz und Nieren wieder.

2.3.2.5 Reaktionen der Atemwege auf eingedrungenes Antigen

Infektionskrankheiten, die normalerweise über den Respirationstrakt zustandekommen, rufen nicht selten eine generalisierende Erkrankung hervor und haben eine Immunität des Organismus zur Folge. Daher führt auch die Verabreichung infektiöser Antigene über die Atemwege zur Auslösung von Immunvorgängen lokaler und komplexer Art. Letztere sind durch das Auftreten humoraler Antikörper gekennzeichnet.

SELIVANOV (zit.n.ALENKO et al., 2) erklärt den starken Immunisierungseffekt von aerogenen Vakzinationen damit, daß das schnell in den Lymph- und Blutkreislauf gelangende Antigen einen sofortigen Mobilisierungseffekt ausübt, indem es das Lymphsystem und das RES in die Immunogenese mit einbezieht.
Einem Literaturüberblick von FOURNIER (26) ist zu entnehmen, daß die Immunglobuline der drei Klassen IgA, IgG, IgM sowohl nach natürlicher als auch nach artifizieller Immunisierung synthetisiert werden. Diese Immunglobuline treten unabhängig von dem Ort des Eindringens des Antigens auf.

2.3.2.5.1 Unspezifische Abwehrreaktionen

Eingedrungene Fremdpartikel werden im Atemtrakt der Atemluft durch Härchen, Luftfeuchte, Mukoidschicht, Flimmerepithel entzogen.

2.3.2.5.2 Spezifische Abwehrreaktionen

Daneben werden auch spezifische - humorale und zelluläre - Immunmechanismen in Gang gesetzt, die B- und T-Lymphozyten-abhängig sind (54).

Die B-Lymphozyten, aus dem Bursaäquivalent hervorgegangene und zur Antikörpersynthese befähigte Plasmazellen, finden sich in den regionären Lymphknoten des Atemtraktes (Bronchiallymphknoten, Tonsillen, Kopflymphknoten). Sie produzieren IgG- und IgM-Antikörper für die allgemeine Infektabwehr, sekretorische IgA-Antikörper für die lokale Abwehr und IgE-Antikörper, die Träger der sofortallergischen Reaktion.

Die T-Lymphozyten des Thymus sind in der Peripherie der Lymphknoten allgemeiner lymphoider Organe und des Respirationstraktes lokalisiert.
Diese kleinen und großen Lymphozyten bilden die zelluläre Immunabwehr, die das immunologische Gedächtnis (memory-cells), die Abtötung fremder Zellen und Produktion lymphotaktischer Stoffe beinhaltet. Beide Zelltypen kooperieren bei der Infektabwehr und stellen den klinischen Infektionsschutz sicher.

Der Applikationsart entsprechend, werden nach dem Kontakt des Antigens mit der Atemwegsschleimhaut lokale Antikörper gebildet, die anhand ihrer Sedimentationskonstanten von den Serumantikörpern unterschieden werden können.
In erster Linie handelt es sich, neben IgM- und IgG-Antikörpern,um IgA-Antikörper, die hauptsächlichen Träger der lokalen Immunantwort, die von Plasmazellen in der respiratorischen Schleimhaut selbst gebildet werden (PETZOLD, 54). Diese lokalen Antikörper bilden einen stärkeren Schutz gegen Reinfektion als Serum-Antikörper.
IgG-Antikörper, die im Blut zirkulieren, bieten gegen eine respiratorische Erkrankung kaum Schutz. Bei parenteraler Immunisierung fehlt die lokale IgA-Produktion und Anreicherung, die bei lokalem Antigen-Stimulus im Respirationstrakt auftritt.

Nach REYNOLDS und THOMSON (59) sind die immunologischen Reaktionen der Lunge mit denen des Serums nicht zu vergleichen. Sie stellten fest, daß das sekretorische IgA des Bronchialschleims in der Lage ist, Bakterien zu agglutinieren und ihr Wachstum zu hemmen, während IgA, das aus intravaskulärem Vorrat in den Bronchialschleim gelangt, diesen Effekt nicht zeigt.

Die protektive Wirkung der IgA-Antikörper besteht darin, daß sie die Schleimhaut mit einer Schutzschicht überziehen und damit das Anhaften von Bakterien verhindern (79).
Die Mechanismen, die normalerweise im lymphoiden System nach parenteraler Immunisierung ablaufen, werden möglicherweise in lymphoiden Zellen der Submukosa des Bronchialbaumes als Reaktion auf das Penetrieren makromolekularer Antigene durch die Mukosa induziert.
TOMASI (69) teilt mit, daß unter dem Einfluß IgA-spezifischer T-Zellen in erster Linie IgA-produzierende Plasmazellen entstehen, wenn vorher B-Zellen mit oberflächlichem IgA durch geeignetes Antigen stimuliert wurden.
Umstritten ist das Vorhandensein einer 'memory-response' im sekretorischen Immunsystem, das von ANDRÉ sowie ROSSEN (3, 61) angenommen wird, während WALDMANN und GANGULY (76) dafür keine Hinweise fanden.
Normalerweise findet im respiratorischen Parenchym keine Antikörperproduktion statt, da die intrapulmonalen Lymphfollikel wenig aktiv sind. Dagegen zeigen die Bronchial- und Hiluslymphknoten nach lokaler Antigenapplikation eine deutliche Schwellung (45, 39).

Die <u>zelluläre Reaktion</u> ist bislang aufgrund technischer Schwierigkeiten noch relativ wenig erforscht. Makrophagen bzw. Monozyten und lymphoide Organe spielen dabei wohl die Hauptrolle. TOMASI (69) nimmt an, daß die lokale, zelluläre Antikörperproduktion den gleichen Reaktionsablauf hat, wie die des allgemeinen lymphoiden Systems mit Helfer-T-Zellen und Makrophagen. Es wurde festgestellt, daß sich entlang der Trachea und den großen Bronchien lymphoides Gewebe befindet, das in seiner Wirkungsweise den

Peyer'schen Platten der Darmschleimhaut entspricht, deren Lymphozyten, ähnlich wie im Thymus, ohne Antigenstimulus entstanden sind (69). Einzelne Zellen dieses 'bronchial assoziierten lymphoiden' Gewebes wandern in die Lunge und den Gastro-Intestinaltrakt; ebenso finden sich Peyer'sche Platten in der Lunge. Die wichtigste und primäre antibakterielle Aktivität geht in der Lunge von den Makrophagen aus, deren Clearence-Effekt von Bakterienart und Umweltfaktoren abhängig ist (40).
Das Antigen wird durch Phagozytose oder Pinozytose von den Makrophagen aufgenommen, wobei letztere nach NORTH et al. (49), die Folge konstanter physiologischer Aktivität darstellt und nach JERNE (35) zusammen mit Konzentrieren und Transportieren des Antigens die Hauptaufgabe dieser Zellen darstellt.
Er vermutet auch aufgrund der Versuche von GALLILY und FELDMANN (28), daß das Antigen in den Makrophagen an spezifische, auf Membranen gelagerte Antikörpermoleküle gebunden wird, wobei die freie Antigendeterminante den Lymphozyten zur Verfügung steht.
Die Verarbeitung des Antigens in den Lysosomen stellt nach UHR und WEISSMANN (72) einen notwendigen Schritt für die Antikörperinduktion dar.

Die Verteilung der einzelnen Lymphozytentypen in der bronchoalveolären Zellpopulation ist von der in Blut und Milz gänzlich unterschiedlich.

In der Milz existiert ein großer Vorrat an T- und B-Zellen. Während im Blut B-Zellen in der Minderheit sind, fehlen in der Lunge T-Zellen, dafür sollen dort Ig-produzierende B-Zellen vorkommen (36).

Zusätzlich werden pulmonäre, sensibilisierte Lymphozyten an den Schleimhäuten aufgebaut (75); daran beteiligte B-Lymphozyten besitzen angeblich keine 'memory'-Fähigkeit (27).
Die Kooperation von Lymphozyten und Makrophagen geschieht im Respirationstrakt wie in anderen Organen durch den 'Migrations-Inhibitions-Faktor' (MIF). WALDMANN und HENNEY (77) immunisierten Meerschweinchen nasal mit einem artifiziellen Antigen und konnten danach in den Bronchien Lymphozyten nachweisen, die den MIF antigenspezifisch produzierten. Nach subkutaner Immunisierung konnten diese Beobachtungen nicht gemacht werden. Sekretorische Antikörper hemmen die Makrophagenwanderung nicht, die die Bakterieneliminationunterstützt.
Nach DE COTEAU (12) ist damit eine lokale zelluläre Immunität nachgewiesen, die unabhängig von der systemischen durch Aerosole induziert wird.

2.4 Beeinflussung des weißen Blutbildes nach Infektion bzw. Immunisierung

In der Literatur finden sich so gut wie keine Hinweise auf die Beeinflussung der zellulären Blutbestandteile nach Schutzimpfungen. Legt man zugrunde, daß eine Immunisierung eine artifizielle Infektion ist, so lassen sich manche Erkenntnisse und Beobachtungen transferieren, die nicht den Anspruch auf Identität erheben können, aber als Grundlage für eigene Untersuchungen gelten können.

2.4.1 Normalwerte und Bedeutung verschiedener Zelltypen

Grundlegend für die Beurteilung eines Blutausstriches ist die Kenntnis von den Normalwerten und Aufgaben der einzelnen Blutzellen.
Für die bakterielle Infektabwehr sind die phagozytierenden, neutrophilen Granulozyten verantwortlich, die ausschließlich aus dem Knochenmark stammen und dort in sechs bis zwölf Tagen vom Myeloblast zu adulten, segmentkernigen Granulozyten heranreifen.
Im peripheren Blut leben sie maximal einen Tag, beim Einwandern ins Gewebe gehen sie innerhalb kürzester Zeit zugrunde.
Die Eosinophilen stammen ebenfalls aus dem Knochenmark; sie sollen Histamin und histaminähnliche Substanzen vernichten können und bei Antigen-Antikörper-Reaktionen mit beteiligt sein.
Die Granula der Basophilen, die ebenfalls von den Myeloblasten abstammen, enthalten Histamin und Heparin, die wahrscheinlich bei Freisetzung intravasale Gerinnung und Verstopfung der Kapillaren verhindern und somit den neutrophilen Granulozyten den Weg zum Infektionsort freihalten (73).
Die Herkunft der Monozyten ist noch relativ ungeklärt. Sie haben die Möglichkeit zur Phagozytose und können Bakterien und Protozoen durch intrazelluläre Lysis vernichten. Lymphozyten und Plasmazellen sind, wie an anderer Stelle ausführlich beschrieben, maßgeblich an der Synthese von Antikörpern beteiligt (37).

Normalwerte der Leukozyten Tausend/mm^3 (Schwankung) (62)

Mensch	7	5 - 7
Hund	12	8 - 18
Katze	10	9 - 24
Kaninchen	9	6 - 13
Meerschweinchen	12	7 - 19

Prozentuale Verteilung der Leukozyten

	Neutroph.	Eosinoph.	Basoph.	Lympho.	Mono.
Mensch	60-70	2- 4	<1	20-30	5-7
Hund	55-75	3-10	<1	20-15	2-6
Katze	55-60	3- 6	<1	30-35	2-5
Kaninchen	35-55	1- 3	2-6	40-60	2-6
Meerschweinchen	40-45	3- 6	<1	45-50	3-5

2.4.2 Pathologisch verändertes weißes Blutbild

KAMMERMANN-LÜSCHER (38) untersuchte das weiße Blutbild des Hundes bei System- und Organerkrankungen. Inwieweit interne und externe Faktoren Zahl und prozentuale Verteilung der Leukozyten beeinflussen, ist unbekannt. Gesichert ist nur die Tatsache, daß Bakterientoxine, Gewebezerfallsprodukte - pyrogene Substanzen also - und adrenokortikotrope Hormone, eine Granulozytose auslösen können.

Eine Leukozytose, bis auf das Fünffache der Normalwerte, ist in den meisten Fällen eine direkte Antwort auf bakterielle Infektionen. Die daran beteiligten stabkernigen - jungen - Granulozyten und seltener auch Metamyelozyten, sind ein Maß für die Abwehrphase des Organismus und die Schwere der Infektion.

Akute oder anhaltende Infektionen führen zu Reifungsstörungen mit anschließender Leukopenie.

Innerhalb der Zellen finden degenerative Prozesse statt: Basophilie, Vakuolisierung des Plasmas, toxische Granulation und Verklumpung des Kernchromatins.

Eine Leukozytose wird in den meisten Fällen von einer Neutrophilie und Eosinophilie mit Reduzierung der Lymphozyten sowie einer Vermehrung der Monozyten begleitet.
Nach dieser neutrophilen Kampfphase, die ANOSOV et al.(4) bei Meerschweinchen beschreiben, tritt die monozytäre Überwindungsphase auf (Zunahme der Eosinophilen und Monozyten). Die lymphozytäre Heilphase ist ein Zeichen für die Beendigung der Krankheit und Streßsituation, unter der es zu vermehrter ACTH-Ausschüttung mit nachfolgender Blutbildverschiebung kommt.
ANOSOV et al. untersuchten, inwieweit die C-Lecithinase von Cl.perfringens Typ A die Blutzellen verändert. Ihre Ergebnisse stimmen mit den oben zitierten Erkenntnissen überein. Sie unterstreichen lediglich die Aussagekraft ihrer Werte durch zahlenmäßige Veränderungen innerhalb bestimmter Zeiträume nach dem Infektionszeitpunkt. Sie stellten fest, daß der prozentuale Anteil segmentkerniger, neutrophiler Leukozyten, zwei Stunden nach Injektion um das 1,5-fache auf 60,5 % anstieg und nach vier Tagen auf 20,2 % absank.
Bis zu diesem Zeitpunkt betrug die Zahl der stabkernigen Granulozyten mehr als das Doppelte ihres Normalwertes.
Das Auftreten von Myelozyten und Eosinopenie wird in dieser Arbeit genau wie bei KAMMERMANN-LUESCHER (39) beschrieben.

2.5 Serologische Methoden zum Antikörpernachweis

Da biologische Untersuchungen materialaufwendig und relativ wenig empfindlich sind, suchte man nach rationelleren und sensibleren Methoden für die Routinediagnostik.
Auf dem Sektor der Serologie und Immunbiologie wurden entscheidende Fortschritte in diese Richtung getan. Neben den Präzipitationsreaktionen in flüssigen Medien, die lediglich qualitative Aussagekraft besitzen, gelangten die Präzipitationsreaktionen in Gelen zu größerer Bedeutung, da durch sie auch eine Quantifizierung des Antikörpergehaltes möglich ist.

2.5.1 Gel-Präzipitationsreaktionen

Dazu gehören die einfache, lineare Immundiffusion nach OUDIN (51), die lineare Doppeldiffusion nach OAKLEY und FULTHORPE (50), die einfache, radiale Immundiffusion nach MANCINI (46), und die radiale Doppeldiffusion nach OUCHTERLONY (53).

Verwendung finden auch kombinierte, elektrophoretische und immunochemische Verfahren, wie Gegenstromelektrophorese (81) und Elektroimmundiffusion nach LAURELL (43).

2.5.2 Nachweisverfahren für sehr kleine Antigen- bzw. Antikörpermengen

Für relativ geringe Antigen- bzw. Antikörpermengen wird die passive Agglutinationsreaktion oder der Hämagglutinationshemmungstest angewendet.
Die größte Empfindlichkeit zeigen radio- und enzymimmunologische Nachweismethoden.

Fluoreszenzserologische Verfahren weisen häufig unspezifische Reaktionen auf, die sich negativ auf ihre Anwendbarkeit auswirken.

Da in allen Nachweisreaktionen Antigen und Antikörper beteiligt sind, können diese Teste auch zur Bestimmung des Antikörpertiters herangezogen werden. In diesem Falle muß der Gehalt eines Antiserums als Bezugsgröße bekannt sein, um das jeweilige System eichen zu können.

2.5.2.1 Radioimmunassay (RIA)

Erste Befunde durch radioimmunologische Methoden gehen auf Untersuchungen von YULOW und BERSAN (17) zurück. Zur Klärung des Metabolismus von J^{131}-Insulin wurde bei Versuchen festgestellt, daß mit Insulin behandelte Diabetiker insulinbindende Antikörper gebildet hatten. In weiteren Arbeiten wurde festgestellt, daß ein Überschuß die Antikörperbindungsplätze absättigt und andererseits durch Zugabe von unmarkiertem Insulin radioaktiv markiertes J^{131}-Insulin aus dem Gammaglobulinkomplex verdrängt wird.
Ein ähnliches Prinzip wurde für die Bestimmung des Schilddrüsenhormons Thyroxin von EKINS (18) beschrieben. Diese Untersuchungen dienten als Basis für RIA zum Nachweis verschiedenster Substanzen. Durch Variation dieser Verfahren konnten verschiedene Methoden entwickelt werden, die als kompetitive Proteinbindungsanalyse oder Radio-Liganden-Assay bezeichnet werden.
Die außerordentliche Empfindlichkeit beruht zum einen auf der Verwendung radioaktiv-markierter Substanzen, zum anderen auf der extrem hohen Spezifität immunologischer Reaktionen.

Bei hinreichend großer Bindungsaffinität des Antikörpers stellt sich im Lauf der Reaktion zwischen den Reaktionspartnern und dem gebildeten wasserlöslichen Antigen-Antikörper-Komplex ein charakteristisches Gleichgewicht ein. Wird das unmarkierte Antigen (Ag) durch ein markiertes Antigen (Ag^+) ersetzt, das immunologisch mit ersterem identisch ist, so läuft die Reaktion analog ab.

$$Ag + Ak \rightleftharpoons AgAk$$

$$Ag^+ + Ak \rightleftharpoons Ag^+Ak$$

Für das radioimmunologische Meßsystem sind drei Voraussetzungen notwendig:

1. Bindungskonstante K ist für AgAk und Ag^+Ak gleich.
2. Radioaktiv markiertes Antigenmolekül Ag^+ muß im Überschuß vorhanden sein.
3. Innerhalb eines Meßsystems werden die Konzentrationen der radioaktiven Verbindung und die eingesetzte Antikörpermenge konstant gehalten.

Vereinfacht ausgedrückt handelt es sich beim RIA um eine kompetitive Proteinbindungsanalyse.
Eine variable Menge einer Substanz und eine konstante Menge der gleichen Substanz nur radioaktiv markiert, konkurrieren um eine konstante, begrenzte Zahl von Bindungsplätzen des Antikörpers.

$$Ag + Ag^+ + Ak \rightleftharpoons AgAk + Ag^+$$

$$\rightleftharpoons Ag^+Ak + Ag$$

Daraus folgt:

Je mehr unmarkierte Antigene vorhanden sind, desto weniger markierte Antigene werden vom Antikörper gebunden.
Somit ist die Bindung zwischen radioaktiven Antigenmolekülen und Antikörpern ein Maß für die Konzentration der zu bestimmenden Verbindung.
Um den Anteil der komplex gebundenen radioaktivmarkierten Verbindung festzustellen, müssen aus dem Inkubationsgemisch alle unmarkierten und markierten Antigen-Antikörper-Komplexe von nichtgebundenem markierten und unmarkierten Antigen abgetrennt werden.
Dies geschieht aufgrund der Molekülgröße des Antigen-Antikörper-Komplexes, seiner begrenzten Löslichkeit bei bestimmten pH-Werten, verschiedener Wanderungsgeschwindigkeit, durch Denaturierung und Ausfällung mit Salzlösungen oder organischen Flüssigkeiten.
Danach kann aus einer Eichkurve, die mit standardisierten Substanzen erstellt wird, der Gehalt einer Probe direkt abgelesen werden.
Der Gleichgewichtszustand, der sich zwischen beiden Reaktionspartnern einstellt, läßt sich durch das Massenwirkungsgesetz darstellen.

$$\frac{[AgAk]}{[Ag]} = K \left([Ak]_{\circ} - [AgAk] \right)$$

Ag = Antigen
Ak = Antikörper
$Ak_{\circ}$ = Anfangskonzentration des Ak

Zur Auswertung können die Anzahl der beim radioaktiven Zerfall gemessenen Impulse, die Prozentzahl der relativen oder absoluten Bindung gegen die Konzentration oder den Logarithmus der Konzentration des zu untersuchenden Serums im Koordinatensystem aufgetragen werden.

Die dabei entstehenden Eichkurven können, je nach Art der Auftragung die Gestalt einer Geraden, einer Hyperbel oder eine sigmoide Form annehmen. Die Empfindlichkeit des RIA hängt für den Antikörpernachweis von der Spezifität des Antigen ab. Sie ist außerdem umso höher, je stärker das Antigen radioaktiv markiert ist (17).

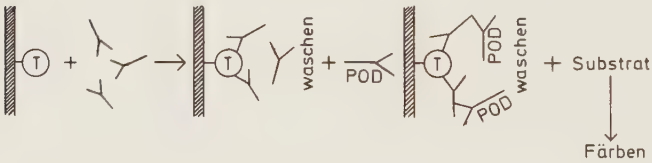
2.5.2.2 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Der ELISA wurde als Alternative zum RIA konzipiert. Damit besteht auch für nicht speziell eingerichtete Laboratorien die Möglichkeit, schnelle und hochsensitive Nachweismethoden durchführen zu können. Das Prinzip des ELISA beruht, wie das des Solid-Phase-RIA, auf der Konkurrenz markierter Antigene bzw. Antikörper mit nicht markierten um die Bindungsstellen des spezifischen Antikörpers bzw. Antigen.

Nach Einführung dieses Prinzips durch ENGVALL und PERLMANN (19) wurde der Test weiter modifiziert, um Anwendungsmöglichkeiten und Nachweisgrenzen zu verbessern.
Wesentliche Voraussetzung zur Durchführung dieser Methode ist die unspezifische Proteinbindung an Polystyrol, die auch durch Waschung nicht gelöst wird.
Für die physikalischen und chemischen Voraussetzungen der Adsorption gibt es in der Literatur verschiedene Angaben. Die pH-Werte des Anlagerungspuffers schwanken zwischen 7 und 9,6, und als Inkubationstemperatur werden + 4° oder + 37° C mit und ohne Wasserbad empfohlen (23, 80).

Zur Antikörperbestimmung erfolgt die Anlagerung des Antigens im vorliegenden Falle des Enterotoxin B an Polystyrol-1/2 Mikroküvetten. Nach Inkubation und Waschung wird das zu untersuchende Serum angelagert. Vorhandene Antikörper werden durch das an der Küvettenwand haftende Antigen fixiert. Zum Nachweis der gebundenen Antikörper wird nach Inkubation und Spülung ein enzymmarkierter Anti-Antikörper zugesetzt, der nach den gleichen Reaktionsbedingungen wie der Antikörper angelagert wird und sich vornehmlich an das Fc-Stück des Antitoxinmoleküls bindet (23).
Die gebundene Enzymmenge wird durch die Farbveränderung einer zugegebenen Substratlösung photometrisch ermittelt, und ist ein Maß für den Betrag spezifischer Antikörper im Serum (12).

Schema des ELISA-Sandwichverfahrens nach FEY (23)



T = Polystyrol mit Antigen

= Antikörper

POD = Peroxydasemarkierter Anti-Antikörper

3. Eigene Versuche

3.1 Material

3.1.1 Staphylokokken-Enterotoxin B zur parenteralen Immunisierung

Zur Immunisierung wurde gereinigtes, lyophilisiertes Enterotoxin B mit 80 % serologischer Aktivität vom Institut zur Verfügung gestellt.
Die Lösung erfolgte in physiologischer NaCl-Lösung.

3.1.2 Referenzsera

Als Referenzsera wurden Enterotoxin B-Antisera aus dem Labor für Mikrobiologie SanAkBw*München (SET-AS B 74) und Gammaglobulin eigener Herstellung verwendet.
*Sanitäts Akademie der Bundeswehr

3.1.3 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden Kaninchen 'Deutsche Riesen-Hybriden' der Fa. RIEDEL, München-Feldmoching, ca. 1 Jahr alt, Gewicht ca. 2,5 kg, weiblich und männlich verwendet.
Die Tiere wurden in Einzelkäfigen auf Heueinstreu gehalten, mit 'Altromin' Alleinfutter (Pellets) (Fa. STETTNER, München) und Wasser ad libitum versorgt.

3.1.4 Geräte zur Aerosolerzeugung

Für die aerogene Immunisierung wurde in steigenden Dosen natives Toxin, in Aqua dest. gelöst, verwendet. Zur Aerosolerzeugung wurde ein Inhalationsgerät der Firma PARI, Starnberg, Typ 'Privat' eingesetzt. Die Arbeitsweise gleicht dem Prinzip des unter 2.3.2.2 beschriebenen Atomizerverfahrens. Der Aufbau ist Abb. Nr. 3 zu entnehmen. Die zu vernebelnde Flüssigkeit wird in den Medikamentenbecher eingefüllt und verläßt als Aerosol die Verneblerkuppel, in deren Ansatzstück ein Glaszylinder eingebaut wird. Der Vernebler wird mittels eines Kompressors betrieben, der eine Nebelleistung von 16 l/min mit einer Teilchengröße von 0,5 - 5,5 Mikron erzeugt.

Abb. 3

Aufbau des PARI Verneblers

3.1.5 Tabellarische Material- und Reagenzienaufstellung

Material zur Blutentnahme

70 %iger Alkohol
Einmalkanülen Luer, Größe 0,8 x 38 mm, (Fa. BRAUN, Melsungen)
Serumröhrchen Typ Q mit Serumtrennern (Fa. GREINER, Nürtingen)

Material zur Leukozytenzählung

Mischpipetten für die Leukozytenzählung
Türk'sche Lösung
Zählkammer nach Neubauer

Material zur Erstellung des Differentialblutbildes

geschliffene Objektträger, 76 x 26 mm
May-Grünwald Lösung
Giemsa Lösung

Reagenzien für den Agar-Gel-Präzipitationstest Microslide und Mancini

Diäthylbarbiturat-Acetat-Puffer, pH 8,2 ; 0.1 m
Na-Diäthylbarbiturat
Na-Acetat

0,1n HCL oder 0,1 n NaOH zur pH-Einstellung
50 ml Puffer, 50 ml H_2O
Agarose (BEHRINGWERKE AG, Marburg)
für Microslide 1 %,
Mancini 2 %

- Färbelösung nach Mancini

Amidoschwarz	1	g
Na-Acetat	4,1	g
Eisessig	30,0	ml
Aqua dest	ad 1000	ml

- Entfärbelösung nach Mancini

Eisessig	50	ml
Glycerin	5	ml
Aqua dest.	ad 1000	ml

Reagenzien für den ELISA

- Anlagerungspuffer

Na-Carbonat-Bicarbonat 0,1 m, pH 9,6

- Waschflüssigkeit

0,9 %ige NaCl-Lösung mit 0,05 % Tween 20

- PBS (Phosphate Buffered Saline) 0,01 m, pH 7,4

Na_2HPO_4

KH_2PO_4

0,9 % NaCl

- Zur Serumverdünnung zusätzlich

0,5 % BSA (Bovines Serum Albumin),(BEHRINGWERKE AG,Marburg)

- Zur Verdünnung des peroxydasemarkierten Anti-Kaninchen-Immunglobulins

4 % BSA

Peroxydasemarkiertes Anti-Kaninchen-Immunglobulin vom Hammel (Institut PASTEUER, Bad Homburg)

Peroxydasemarkiertes Anti-Kaninchen-Immunglobulin von der Ziege (BEHRINGWERKE AG, Marburg)

Lösungen für den Enzymnachweis

K-Phosphat-Puffer 0,1 m, pH 7,0

KH_2PO_4

K_2HPO_4

Guajakol-Lösung 20,1 mM

Guajakol (Fa. RIEDEL de HAEN, Seelze)		0,25	ml
Aqua dest.	ad	100	ml

H_2O_2-Lösung 30 %

H_2O_2 (Fa. MERCK, Darmstadt)		0,14	ml
Aqua dest	ad	100	ml

Reagenzien für den RIA

50 µg Staphylokokken-Enterotoxin B in 0,1 ml Puffer B gelöst

Normalserum vom Kaninchen (Fa. BAG, Lich)

Phosphat-Puffer

Na_2HPO_4

NaH_2PO_4

A 0,5 m pH 7,5

B 0,05 m pH 7,5

B' 0,05 m ph 7,5 0,01 % NaN_3

Chloramin T (Fa. MERCK, Darmstadt) 50 mg in 10 ml Puffer B lösen

Na-Disulfit ($Na_2S_2O_5$) (Fa. MERCK, Darmstadt) 12 mg in 42 ml Puffer B lösen

BSA (BEHRINGWERKE AG, Marburg) 1 g in 20 ml Puffer B' lösen

Na-J^{125} 1 mCi (BEHRINGWERKE AG, Marburg)

Norit, (Fa. SERVA, Heidelberg) 0,4 % in Puffer B lösen
Dextran (Fa. SERVA, Heidelberg) 0,4 % in Puffer B lösen
Säule 10 x 1 cm
Sephadex G 50-fine, (Fa. PHARMACIA, Freiburg) mit Puffer B ansetzen
Säulenvorbereitung:
0,4 ml BSA auftragen, mit 20 ml Puffer B' eluieren

3.2 Methode

3.2.1 Immunisierung

3.2.1.1 Parenterale Immunisierung der Versuchstiere

Für diese Immunisierung standen 6 Kaninchen (Nr. 1-6) zur Verfügung. Vor Versuchsbeginn wurde jedem Tier aus der V. auricularis rostralis Blut entnommen und im Microslide-Test, als Suchtest für präzipitierende Antikörper, auf etwaige Enterotoxin B-Antikörper untersucht. Nachdem dieser Test negativ verlief, wurde mit der Immunisierung, wie in Tabelle 2 dargestellt, bei den Tieren 1 - 5 begonnen.
Kaninchen Nr. 2 verendete bereits nach der ersten Injektion und wird deshalb nicht aufgeführt.
Kaninchen Nr. 3 starb nach der dritten Applikation, ohne daß bis zu diesem Zeitpunkt Antikörper nachgewiesen werden konnten.
Für die ersten drei Impfungen wurde 0,5 ml gelöstes Toxin (s. 3.1.1) zu gleichen Teilen mit inkomplettem Freund'schen Adjuvans gemischt; später wurde letzteres nicht mehr zugesetzt.
Die subcutane Applikation wurde im dorsalen Scapulabereich vorgenommen, die intravenöse in die V. auricularis rostralis.

Tabelle 2

Versuchstag	Menge	Art	Adjuvans	
1.	20 µg	s.c.	+	(01.08.77)
8.	20 µg	s.c.	+	(08.08.77)
16.	30 µg	s.c.	+	(16.08.77)
22.	40 µg	s.c.	-	(22.08.77)
29.	40 µg	i.v.	-	(29.08.77)
36.	50 µg	i.v.	-	(05.09.77)
71.	100 µg	i.v.	-	(10.10.77)
78.	120 µg	i.v.	-	(17.10.77)
102.	150 µg	i.v.	-	(10.11.77)
128.	180 µg	i.v.	-	(06.12.77)
166.	200 µg	i.v.	-	(13.01.78)
177.	250 µg	i.v.	-	(24.01.78)
229.	300 µg	s.c.	-	(17.03.78)
292.	400 µg	i.v.	-	(19.05.78)

Da Kaninchen Nr. 3 am 20. Versuchstag verendete, wurde Kaninchen Nr. 6 am 21. Versuchstag mit einbezogen. Die ersten Immunisierungen wurden bei Kaninchen Nr. 6 wie folgt vorgenommen:
22., 29., 36. Versuchstag 20 µg s.c. mit Adjuvans danach wurde ab dem 71. Versuchstag die Immunisierung wie bei den Tieren Nr. 1, 4 und 5 durchgeführt. Kaninchen Nr. 1 konnte ab dem 215. Versuchstag nicht mehr in die Untersuchungen mit einbezogen werden.

3.2.1.2 Aerogene Immunisierung

Vier Tiere (Nr. 7, 8, 9, 10) standen für den Versuch zur Verfügung, der mit den Tieren Nr. 7 und 8 begonnen wurde, Nr. 8 starb nach der ersten Behandlung.

Den Tieren wurden keine Adjuvantia zusätzlich verabreicht.

Die Immunisierung erfolgte individuell am Versuchstier. Das Kaninchen wurde von einem Helfer fixiert, die Atemöffnungen in das Zentrum des als Atemmaske dienenden Glastrichters plaziert und dadurch direkt dem Luftstrom ausgesetzt. Durch Andrücken der Glasränder an Ober- und Unterkiefer sollten größere Aerosolverluste vermieden werden.

Die Zeitpunkte der einzelnen Aerosolapplikationen für Kaninchen Nr. 7 und 8 sind aus Tabelle 3 zu ersehen.

Tabelle 3

Versuchstag		Menge	
1.		100 µg	(18.01.78)
6. - 9.	je	100 µg	(23.01. - 26.01.78)
14. - 17.	je	200 µg	(31.01. - 03.02.78)
22. - 23.	je	400 µg	(08.02. - 09.02.78)
27. - 30.	je	400 µg	(13.02. - 16.02.78)
35. - 38.	je	400 µg	(21.02. - 24.02.78)
42. - 44.	je	800 µg	(28.02. - 02.03.78)
48.		800 µg	(06.03.78)
85.		400 µg	(10.04.78)
93. - 94.	je	1200 µg	(18.04. - 19.04.78)
107. - 108.	je	1600 µg	(02.05. - 03.05.78)
112.		1600 µg	(07.05.78)
141.		2100 µg	(05.06.78)
145.		2100 µg	(09.06.78)
166.		2800 µg	(30.06.78)
169.		2800 µg	(03.07.78)

Die Behandlung der Kaninchen Nr. 9 und 10 wurde am 23. Versuchstag gemäß Tabelle 3 begonnen und fortgesetzt.

3.2.2 Blutuntersuchungen

An der V. auricularis rostralis oder an der A. auricularis med. wurde Blut für die verschiedenen Untersuchungen abgenommen.

3.2.2.1 Vorbereitung für das Differentialblutbild

Die Blutausstriche wurden an Ort und Stelle gefertigt und nach MAY-GRÜNWALD gefärbt (42).

3.2.2.2 Bestimmung der Gesamt-Leukozytenzahl

Zur Leukozytenzählung wurde Blut in Leukopipetten aufgezogen und mit Türk'scher Lösung gemischt.
Die Auswertung erfolgte nach 30 - 60 Minuten mit einer NEUBAUER-Zählkammer bei 40-facher Vergrösserung im Lichtmikroskop (42).

3.2.2.3 Serumgewinnung

Für die Serumgewinnung wurde das Blut in Einmalröhrchen der Fa. GREINER, mit Quarzwatte versehen, aufgefangen.
Die Abtrennung des Serums erfolgte durch Zentrifugieren bei 1000 g. Das Serum wurde mittels Serumtrenner dekantiert, anschließend portioniert, ausgetestet, eingefroren, lyophilisiert und bei -40°C gelagert.

3.2.3 Herstellen von Gammaglobulin und Messen des Proteingehalts

Die Gammaglobulinfällung wurde nach der Anleitung von FEY durchgeführt (21).
Gleiche Mengen Serum und gesättigte Ammonsulfatlösung werden bei +4°C auf einem Magnetrührer gemischt und für mindestens vier Stunden im Kühlschrank gerührt. Anschließend wird bei 6000 g für 30 Minuten kühl zentrifugiert.
Der Überstand wird dekantiert, das Zentrifugat in max. 5 ml physiol. NaCl gelöst und unter ständigem Rühren 30 Minuten mit gesättigter Ammonsulfatlösung gemischt, daß eine Endsättigung von 40 % entsteht; anschließend wird nochmals wie oben zentrifugiert.
Diese Fällung wird noch einmal wiederholt.
Das gewonnene Zentrifugat wird in einer möglichst geringen Menge 0,9 % NaCl gelöst und anschließend für 12 Stunden gegen 0,9 % NaCl dialysiert.
Durch Fällungsreaktion mit 1 %iger $BaCl_2$-Lösung wird das Dialysat auf SO_4^{2-}-Ionen untersucht.
Mit Biuret-Reagenz wurde der Proteingehalt der aus dem Anti-Enterotoxin B-Serum gefällten Gammaglobulinlösung bestimmt.

3.2.4 Serologischer Nachweis von Anti-Enterotoxin B

3.2.4.1 Agar-Gel-Präzipitationstest

Zweidimensionaler Objektträger-Gel-Präzipitationstest

Der Objektträger-Test wurde wie folgt ausgeführt: Objektträger, 76 x 26 mm, werden an beiden Schmalenden mit wasserfester Folie, 2 cm breit, 1 mm hoch umwickelt. In das freibleibende Feld wird flüssiger 1 %iger Agarose-Agar, in 0,1 m Diäthylbarbiturat-Acetat-Puffer pH 8,2, pipettiert.
Nach Erstarren werden mit einer Lochstanze ein zentrales und sechs periphere Löcher ausgehoben, deren Inhalt ca. 0,004 ml beträgt.
Die Objektträger wurden mit Serum im Zentrum und Toxin, in Aqua dest. gelöst, in den peripheren Löchern beschickt und bei + 37° C für 15 bis 24 Stunden in der feuchten Kammer belassen; direkt anschließend erfolgte die Beurteilung über einer Lichtquelle.

Einfache Radiale Immundiffusion
nach 'MANCINI' (modifiziert zur Antikörperbestimmung)

Das Agar-Gel für den MANCINI-Test wurde nach Rezeptur der BEHRINGWERKE AG, Marburg hergestellt.
Das flüssige Agar-Gel wurde auf + 57° C abgekühlt. 10 ml Gel wurden 45 µg Enterotoxin B in 0,1 ml PBS gelöst zugesetzt, auf einem Shaker gemischt und auf einem Nivelliertisch in einem Rahmen auf Objektträger, 72 x 50 mm, ausgegossen. Die Gel-Dicke betrug 3 mm.
Mit einer Stanze wurden pro Platte zehn Löcher mit einem Inhalt von 0,017 ml ausgehoben, in die das zu untersuchende Serum in verschiedenen Verdünnungsstufen eingefüllt wurde.

Die beschickten Platten wurden auf dem Nivelliertisch bei Zimmertemperatur in einer feuchten Kammer für 24 Stunden aufbewahrt.
Nach Spülen, Trocknen, An- und Entfärben wurde der Präzipitationsring ausgemessen.
Gemessen wurde mit einem Meßokular zum Stereo-Mikroskop der Fa. WILD, Heerbrugg, Schweiz, dessen Strichplatte (Intervall zu 0,1 mm) mit der Skaleneinteilung eines Objektmikrometers in Deckung gebracht wurde. Das Meßsystem wurde täglich geeicht und der Umrechnungsfaktor nach Anleitung der Fa.WILD wie folgt ermittelt:
Der 0. und 6. Teilstrich der Okularmeßeinteilung entsprachen neun Intervallen der Objektmikrometereinteilung. Somit ist ein Intervall der Okulareinteilung 9/6 = 1,5. Für die Umrechnung der Intervallwerte auf mm wird der Umrechnungsfaktor F ermittelt. Dazu wird der Wert 1,5 mit 0,1 mm, dem Wert der Objektmikrometereinteilung, multipliziert; somit ist F = 0,15 mm.
Der Durchmesser der Präzipitationsringe wird mit dem Meßokular ausgemessen, und dieser Zahlenwert mit dem Faktor F = 0,15 mm multipliziert. Für die weitere Auswertung wird das Quadrat des Durchmessers verwendet.

3.2.4.2 RIA

Markierung von Enterotoxin B mit J^{125}

Die Markierung wurde nach der von HUNTER (33) angegebenen Methode durchgeführt. Verwendet wurde J^{125} der BEHRINGWERKE AG, Marburg, und Enterotoxin B wie unter 3.1.5 beschrieben.

In das Versandgefäß, das 1 mCi J^{125} in 0,0022 ml NaJ gelöst enthielt,wurden nach Zentrifugation bei 1000 g 5 µg Enterotoxin B, 0,01 ml Puffer A, 0,01 ml Chloramin T und 0,86 ml $Na_2S_2O_5$-Lösung zugegeben. Dieses Reaktionsgemisch wurde auf die vorbehandelte Säule, s. 3.1.5, gebracht und mit Puffer B' eluiert. Das Eluat wurde in Fraktionen zu je zehn Tropfen (0,7 ml) aufgefangen.

Die Radioaktivität der Fraktionen wurde gemessen und graphisch dargestellt, der erste Peak des Elutionsdiagramms enthielt das markierte Protein. Unter den gewählten Bedingungen enthielt nach der Markierung jedes Proteinmolekül theoretisch 1-2 Atome J^{125}, was einer spezifischen Aktivität von 75-150 mCi/µg Protein entsprach.
Um die spezifische Aktivität des markierten Proteins wenigstens überschlagmäßig zu bestimmen, ging man davon aus, daß die Ausbeute an Protein unter den gegebenen Bedingungen bei etwa 60 - 80 % lag, d.h. daß sich die im ersten Peak befindliche Radioaktivität auf eine Proteinmenge von 3 - 4 µg verteilte.

Versuchsanordnung für den RIA (68)

Von den zu untersuchenden Sera wurden mit PBS Verdünnungsstufen ($1 \cdot 10^{-3}$, $2 \cdot 10^{-3}$, $4 \cdot 10^{-3}$, ... $64 \cdot 10^{-3}$) hergestellt. Als positives Kontrollserum wurde Kaninchen Anti-Enterotoxin B-Gammaglobulin eigener Produktion verwendet; als negative Kontrolle Kaninchennormalserum der Fa. BAG, Lich. Jede Verdünnungsstufe wurde dreifach angesetzt und die davon gemessenen Werte gemittelt.

Pro Röhrchen wurden vorgelegt:
0,1 ml Serum, 0,1 ml Puffer B' (s. unter 3.1.5) und 0,1 ml markiertes Enterotoxin B-J^{125} (ca. 7 ng.).
Anschließend wurde bei + 37° C im Wasserbad für zwei Stunden inkubiert; danach für zwei Stunden bei + 4° C.
Nach Zusatz von 1 ml einer 0,4 %igen Norit-Dextran-Suspension pro Röhrchen wurde das Reaktionsgemisch für eine Stunde bei + 4° C vertikal gedreht und anschließend bei 820 g in der Kühlzentrifuge zur Sedimentation des Adsorptionsmittels zentrifugiert.
Hierauf wurden 0,5 ml des Überstandes entnommen, in neue 'Bio-Vials' (Fa. BECKMANN, München) umgefüllt und im Bohrloch eines Szintillationszählers (NaJ-Kristall, 2 x 2,5 Zoll, als Detektor) (Fa. FRIESEKE & HÖPFNER, Erlangen) für 30 Sekunden gemessen.
Die Meßwerte wurden gemittelt und die prozentuale Aktivität im Vergleich zur eingesetzten Aktivität errechnet.
Pro Versuchstag wurde eine Eichkurve anhand der Ergebnisse der negativen Kontrolle in Bezug auf die Verdünnungsstufen erstellt.

3.2.4.3 ELISA

Versuchsanordnung für die einzelnen Anlagerungsphasen

Für den ELISA-Test wurden 1/2 Mikroküvetten der Fa. GREINER, Nürtingen, Schichtdicke 10 mm - Inhalt 1 ml - verwendet.
Zur Anlagerung des Toxins wurden 100 µg/ml Enterotoxin B, in Na-Carbonat-Bicarbonat Puffer gelöst, pro Küvette 1 ml eingefüllt und bei + 37° C für 24 Stunden inkubiert. Es folgte eine dreimalige Spülung mit Tween-NaCl-Lösung (0,9 % NaCl, 0,05 % Tween 20) (22, 23, 78).
Nach der Trocknung wurden die Küvetten sofort weiterverwendet oder bei + 4° C im Kühlschrank gelagert.

Die zu untersuchenden Sera wurden mit PBS, enthaltend 0,5 % BSA auf die Versuchsverdünnung (1 : 200, 400, 800, 1600) eingestellt, davon je 1 ml im Doppelansatz in die Küvetten eingefüllt und bei + 37° C für 30 Minuten im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde wieder gewaschen und Restflüssigkeiten mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt.

Peroxydase-markiertes Anti-Kaninchen-Immunglobulin des INSTITUT PASTEUR bzw. der BEHRINGWERKE AG, Marburg, wurde in einer Verdünnung von 1 : 100, pro Küvette 1 ml, einpipettiert und bei + 37° C im Wasserbad für 30 Minuten inkubiert.
Anschließend wurde das Serum abgesaugt, die Küvetten dreimal mit Tween-NaCl-Lösung gespült und getrocknet.

Photometrische Messung des gebunden Enzym-Komplexes (57)

Zum Nachweis des gebundenen peroxydase-markierten Anti-Kaninchen-Immunglobulins wurden als Substrat H_2O_2 und Guajakol als Indikator,in 0,1 m Phosphatpuffer pH 7,0 gelöst, verwendet.
Die Konzentration der H_2O_2-Lösung wurde an jedem Versuchstag mit dem Zeiss-Spektral-Photometer bei 240 nm in Quarz-Küvetten 1000 auf eine Extinktion von 0,485 ($\pm$ 0,02) eingestellt.
Pro Küvette wurde 1 ml Phosphat-Puffer, 0,05 ml Guajakol-Lösung und 0,03 ml H_2O_2-Lösung zugesetzt.
Die Messung erfolgte bei 436 nm im Eppendorf-Photometer gegen Leerwert (beschichtete Küvette ohne peroxydase-markiertes Anti-Kaninchen-Immunglobulin mit Reaktionsgemisch).
Die Peroxydase-Reaktion besteht aus zwei aufeinanderfolgenden 1-Elektron-Schritten. Im Falle von Guajakol als Indikator geht eine peroxydatische Dehydrogenierung nach folgender Gleichung vor sich:

$$4\ H_2O_2 + 4\ DH_2 \xrightarrow{POD^*} 8\ H_2O_2 + D_4$$

D_4 ist in diesem Falle Oktadehydro-tetraguajakol, dessen Bildung ein Maß für die POD-Aktivität ist und photometrisch gemessen wird.

Es wurde die Zeitspanne für die Zunahme der Extinktion $\Delta E=0,1$ mittels Stoppuhr in Sekunden ermittelt. Reaktionszeiten über 600 Sekunden wurden als negativ bewertet, da die Intensität der Färbung nach 10 Minuten um 4 bis 5 % abnimmt.
Die Auswertung des Meßergebnisses geschah über folgende Formel:

$$\frac{0,17}{\Delta t} = (U/ml)$$

Als Referenz-Serum wurde das bereits erwähnte Gammaglobulin in den korrespondierenden Verdünnungen verwendet. Anhand dieser Werte wurde für jeden Versuchstag eine eigene Eichkurve erstellt, über die der Proteingehalt in mg/ml der zu untersuchenden Sera ermittelt wurde.
Setzt man in diese Formel für $\Delta t = 600$, so resultiert daraus ein Wert von $2,8 \cdot 10^{-4}$ (U/ml), der als Nullinie in der Eichkurve erscheint.

* POD = Peroxydase

4. Ergebnisse

4.1 Auswertung der Blutuntersuchungen

4.1.1 Beurteilung der Gesamt-Leukozytenzahl

Vom ersten Tag der Immunisierung an wurde den Tieren einen Monat lang täglich Blut entnommen, um Auswirkungen des Toxins auf die Blutzellen festzustellen. Nach der ersten Impfung trat eine starke Erhöhung der Gesamt-Leukozytenzahl auf, die sich im Verlauf der anschließenden Woche wieder auf den Normalwert einspielte, um dann nach der dritten Injektion stark abzusinken, auf nahezu die Hälfte der Ausgangswerte. In diesem Bereich bewegten sich die Werte bis zur fünften Boosterung.
Nach einer dreiwöchigen Erholungsphase kehrten die Blutwerte wieder in den physiologischen Bereich zurück, s. Abb. Nr. 4 und 5.

4.1.2 Beurteilung des Differentialblutbildes

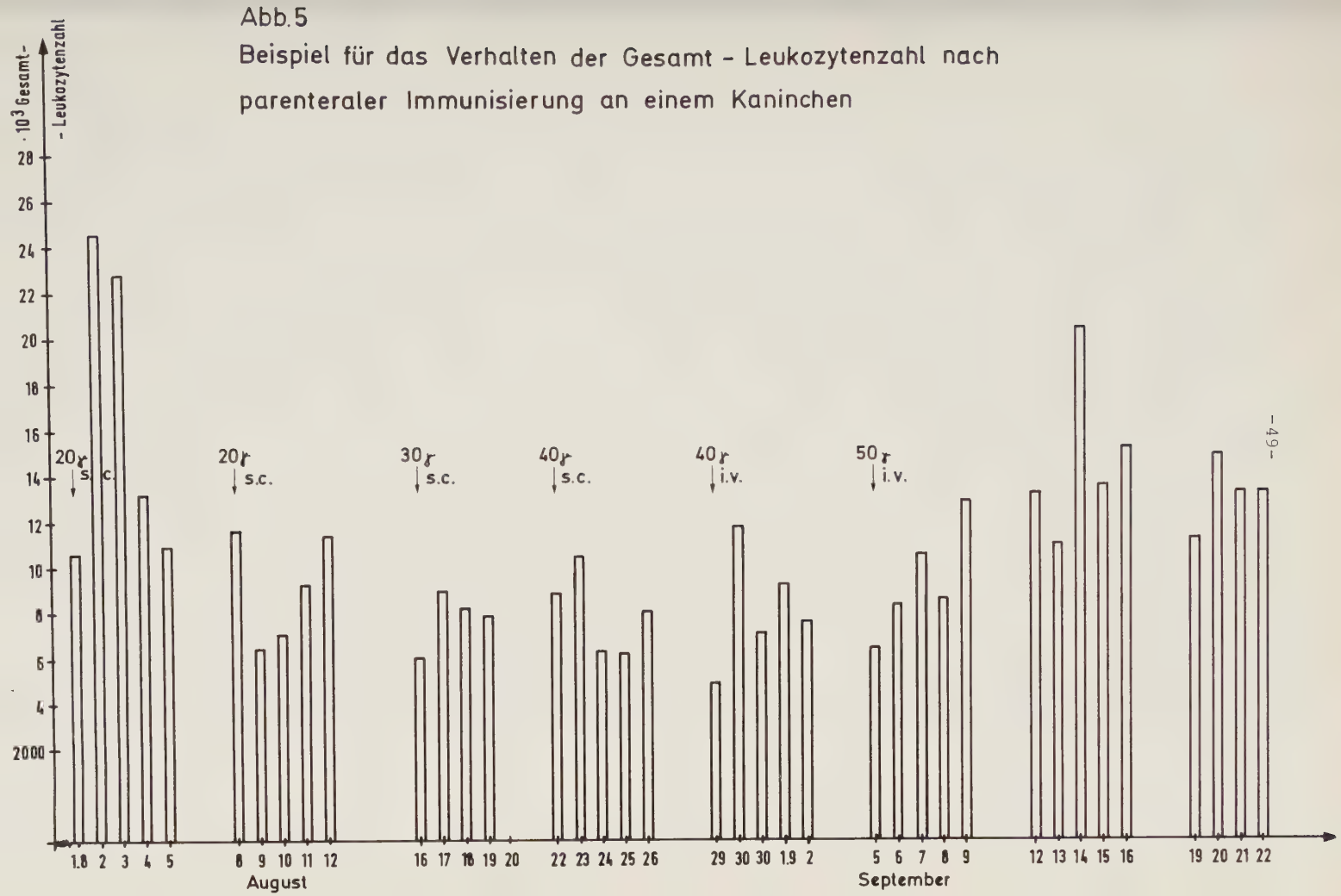
Im Differentialblutbild konnten bis zur ersten Boosterung keine signifikanten Veränderungen festgestellt werden. Lymphozyten- und Leukozytenzahlen bewegten sich bis dahin innerhalb der physiologischen Schwankungsbreite, während sich die Anzahl der Monozyten drei Tage nach der ersten Injektion verdreifachte.
Diese Erhöhung blieb mit geringfügigem Absinken bis zur dritten Boosterung bestehen; danach lagen die Werte wieder im physiologischen Bereich.

Leukozyten und Lymphozyten pendelten auch unmittelbar nach der ersten Boosterung im Schwankungsbereich ihrer physiologischen Werte; am dritten Tag p.vacc. stiegen die Werte der Lymphozyten deutlich an, während die Leukozytenzahl absank.

Abb. 4
Reaktion der Gesamt-Leukozytenzahl auf die Grundimmunisierung bei allen 5 Kaninchen

Abb.5

Beispiel für das Verhalten der Gesamt - Leukozytenzahl nach parenteraler Immunisierung an einem Kaninchen



Diese Veränderung blieb auch nach den folgenden Boosterungen bestehen.

4.2 Ergebnisse aus den serologischen Nachweismethoden von Anti-Enterotoxin B

Da nicht an allen Untersuchungstagen ausreichend Serum für alle Nachweismethoden gewonnen werden konnte, fehlen einzelne Ergebnisse in den nachfolgenden Graphiken.

4.2.1 Agar-Gel-Präzipitationstest

Microslide

Die Ergebnisse des Microslide-Tests hatten rein qualitative Aussagekraft.
Er diente zur Orientierung über eine bereits stattgefundene Immunantwort.
Die erste positive Reaktion trat hier gleichzeitig mit der im MANCINI-Test auf.

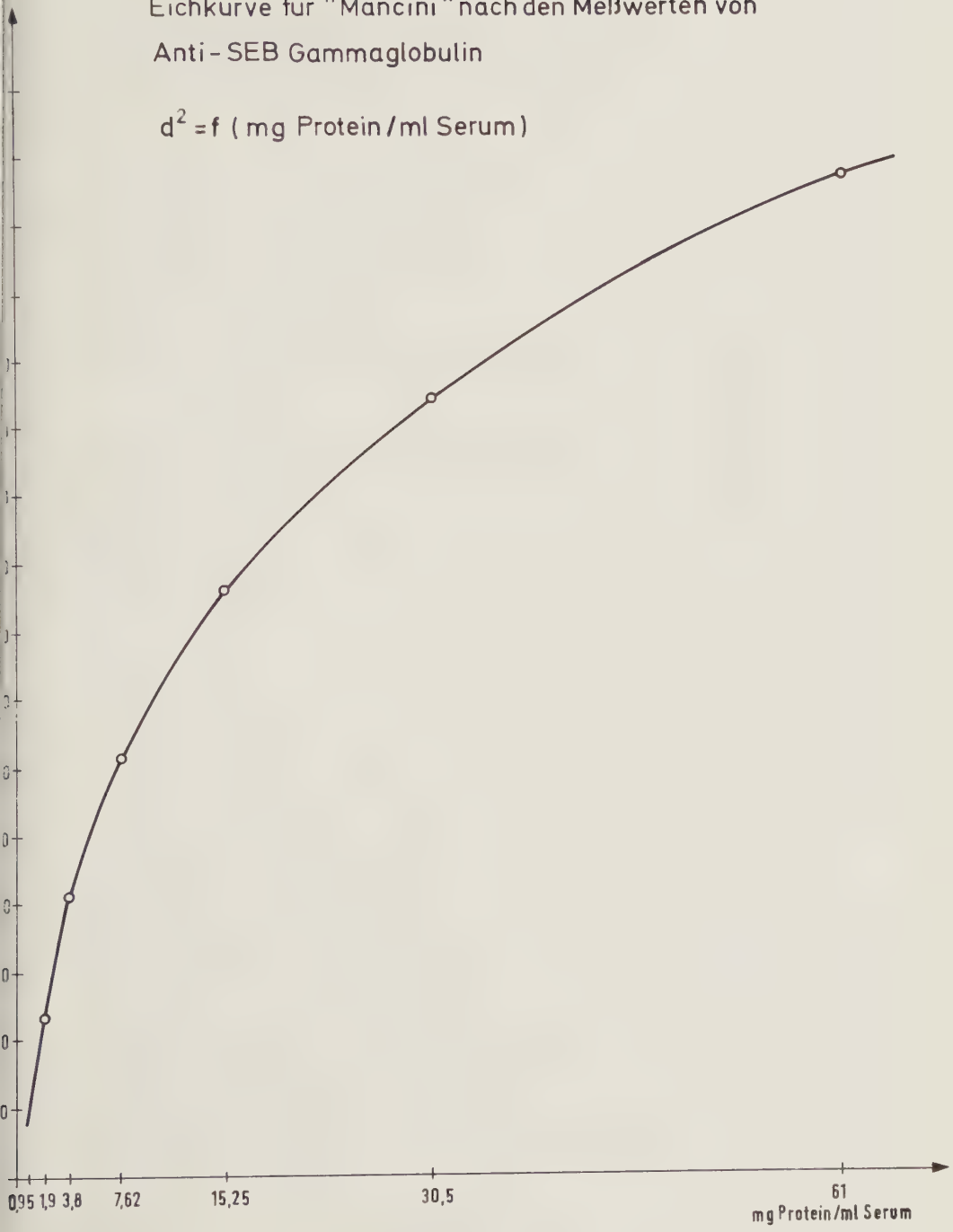
MANCINI-Test

Da hier bei jeder Versuchsserie die gleichen Grundsubstanzen in bekannter und definierter Konzentration verwendet wurden, war es möglich, diese Ergebnisse zu quantifizieren und miteinander zu vergleichen. Anhand der Werte des Referenzserums, Kaninchen-Anti-Enterotoxin B-Gammaglobulin, wurde folgende Beziehung als Grundlage des einfachen 'Radialen-Immundiffusions-Test' erstellt:
Der Durchmesser des Präzipitationsringes ist abhängig vom Antikörpergehalt des Antiserums.
Da es keine Maßeinheit für den Antikörpergehalt gibt, wurde in dieser Arbeit der Proteingehalt der Anti-Enterotoxin B-Gammaglobulin-Lösung als Bezugsgröße verwendet.
Durch Verwendung nachfolgender Meßwerte wurde eine Eichkurve erstellt (Abb. Nr. 6).

Abb. 6

Eichkurve für "Mancini" nach den Meßwerten von Anti-SEB Gammaglobulin

$d^2 = f$ (mg Protein / ml Serum)



Verdünnungsstufe	Proteingehalt mg/ml	Durchmesser mm^2
0	61	1481
1 : 2	30,5	1153
1 : 4	15,75	865
1 : 8	7,87	619
1 : 16	3,93	414
1 : 32	1,96	236

4.2.1.1 Auswertung der Antikörperwerte nach parentaler Applikation

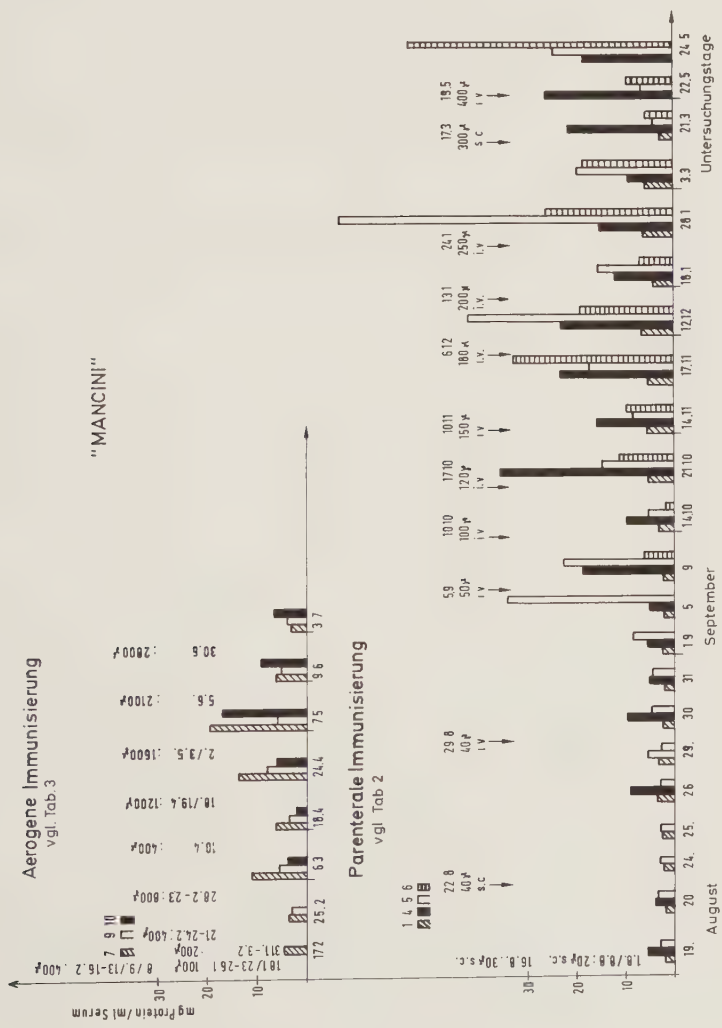
Nach subcutaner Applikation war erst ab dem dritten Tag nach der zweiten Boosterung der Präzipitationsring meßbar und konnte über die Eichkurve einem korrespondierenden Wert des Proteingehalts zugeordnet werden, der unter 10 mg/ml Serum lag. Der Anitkörpertiter änderte sich nur unwesentlich und ergab bis zur Verdünnungsstufe 1 : 2 eine meßbare Präzipitation.

Nach Übergang zur intravenösen Applikation stieg die Nachweisgrenze auf 1 : 16 an, und der Proteingehalt, bezogen auf das Referenzserum, lag zwischen 20 und 30 mg/ml Serum.
Nach Erreichen eines bestimmten Antikörpertiters führte eine Steigerung des Toxingehalts pro Injektion zu keiner weiteren Erhöhung der präzipitierenden Antikörper.
Die individuelle Immunreaktion der Versuchstiere war sehr unterschiedlich, trotzdem konnte eine einheitliche Tendenz im Immunverhalten als Antwort auf die Toxinverabreichung festgestellt werden (Abb. Nr. 7).

4.2.1.2 Auswertung der Antikörperwerte nach aerogener Applikation

Die ersten präzipitierenden Antikörper traten bei Kaninchen Nr. 7 erst am 31. Versuchstag auf, nach 16 Inhalationen, die mit steigenden Dosen (100 bis 400 µg) durchgeführt wurden.

Abb. Nr. 7 : Im MANCINI nachgewiesene Antikörper nach parenteraler und aerogener Immunisierung bezogen auf den Proteingehalt des Referenzserums



Kaninchen Nr. 9 und 10 wurden erst am 23. Tag in den Versuch mit einbezogen (siehe Tab. 3, 3.2.1.2). Belastungen, die zu Ausfällen der Versuchstiere durch die Aerosolbehandlung geführt hätten, konnten aufgrund der Beobachtungen an Kaninchen Nr. 7 und 8 ausgeschlossen werden.

Die ersten positiven Reaktionen waren bei diesen Tieren am 38. bzw. 48. Versuchstag feststellbar. Bei Kaninchen Nr. 9 war der MANCINI-Test am 38. Tag positiv, nach neun Inhalationen mit insgesamt 3600 µg Toxin. Kaninchen Nr. 10 zeigte erst am 48. Versuchstag eine positive Reaktion, nach zwölf Inhalationen mit 6000 µg Toxin.
Der Proteingehalt der Sera lag bei etwa 10 mg, bezogen auf den Gehalt des Referenzserums (Abb. Nr. 7).

4.2.2 ELISA

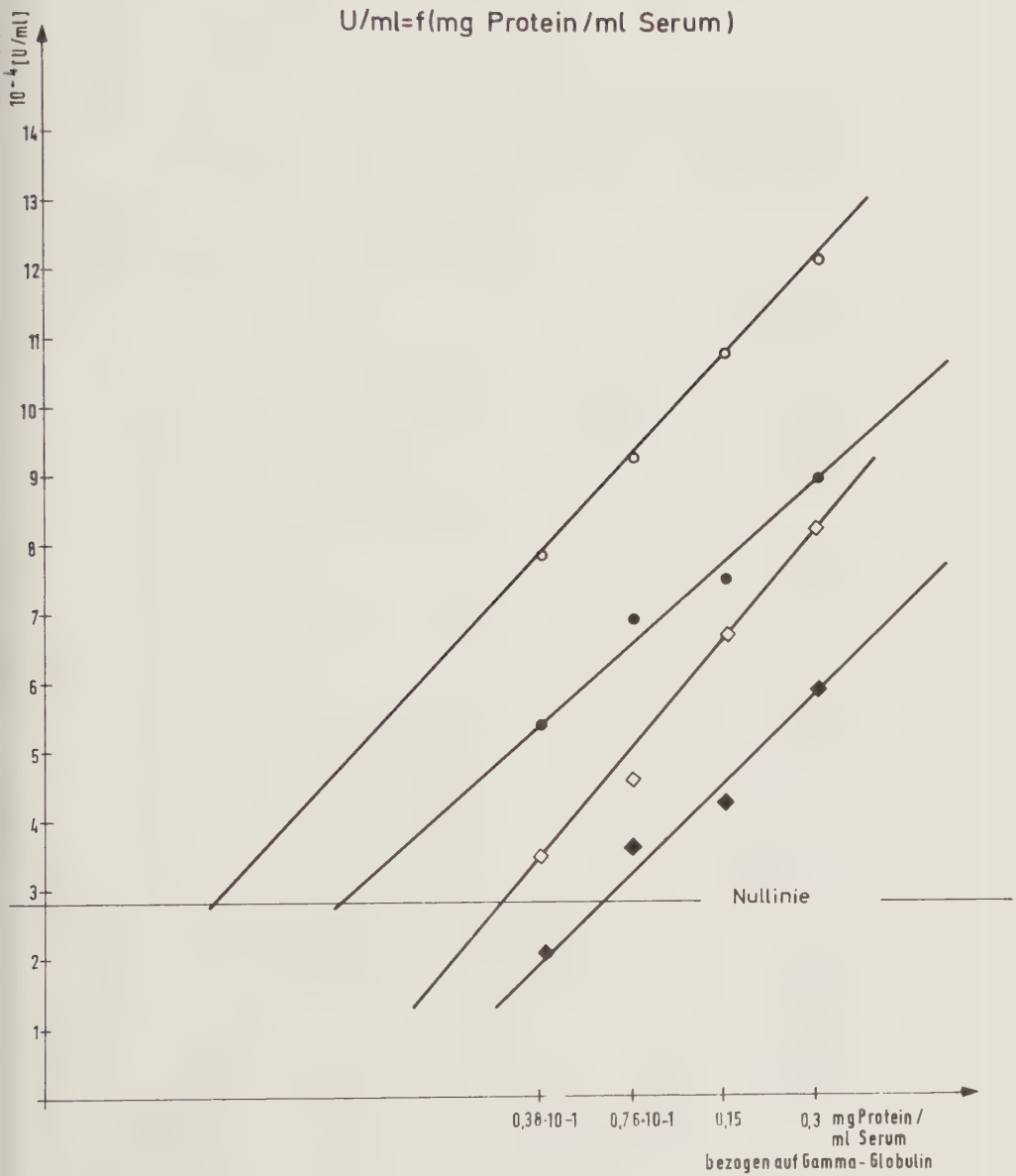
Für jeden Versuchstag wurde anhand der Werte des Anti-Enterotoxin B-Gammaglobulins eine Eichkurve erstellt. Als Beispiel für einige graphische Darstellungen dieser Werte dient Abb. Nr. 8.

4.2.2.1 Nachweis der Antikörper nach parenteraler Immunisierung

Die mit diesem Test erfaßbaren Antikörper konnten erst am 16. Tag nach der ersten Immunisierung nachgewiesen werden.
Bis zu diesem Zeitpunkt wurden noch zwei Boosterungen mit 20 bzw. 30 µg Enterotoxin B verabreicht. Der nach der 4. Boosterung erreichte Antikörpertiter änderte sich bei weiteren Injektionen nicht gravierend, erreichte aber in den meisten Fällen am 3. Tag p.vacc. eine Steigerung im Vergleich zu den dazwischenliegenden Tagen.

Abb. 8

Beispiele f. Eichkurven für den ELISA nach den Meßwerten von Anti-SEB-Gammaglobulin an einzelnen Untersuchungstagen

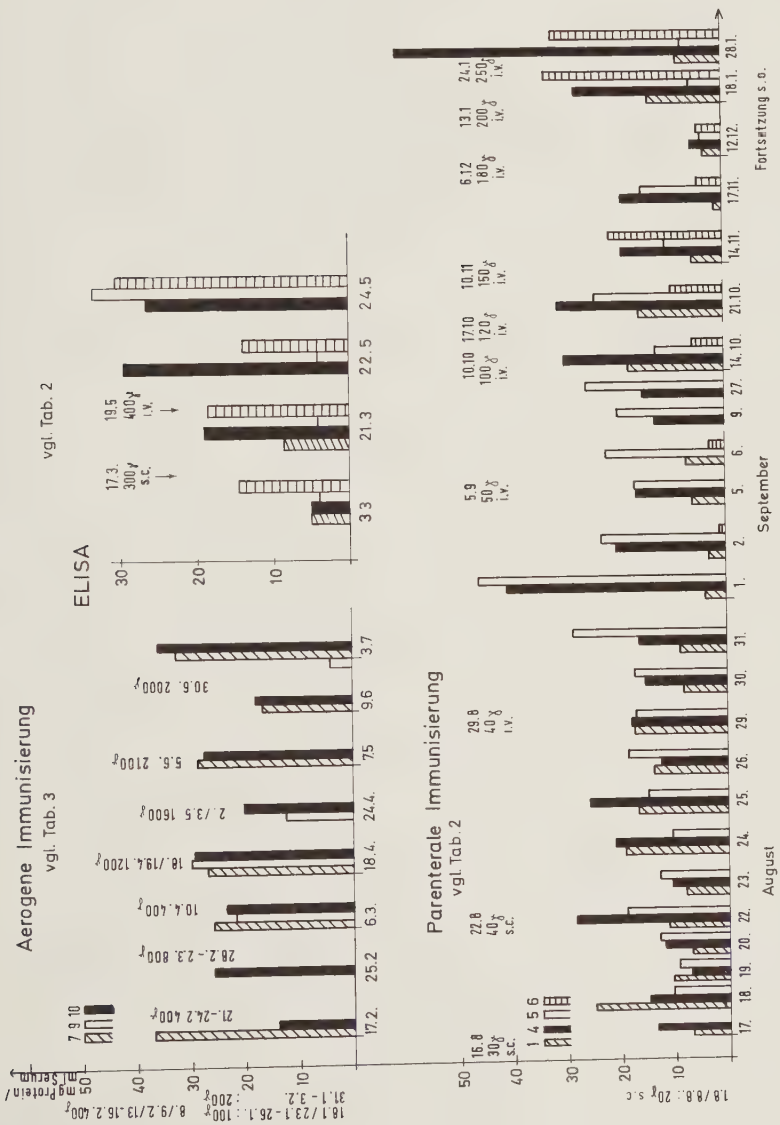


Dem Absinken des Antikörpertiters vor der ersten i.v. Applikation folgte bei 2 Tieren ein Anstieg,der bei einer Immunisierungsdosis von 120 µg/ml stagnierte. Der anschließende Abfall konnte auch durch weitere und höhere Boosterungen nicht gestoppt werden. Eine längere Ruhepause vor erneuter Immunisierung wirkte sich positiv auf das Antikörperverhalten aus. Eine subcutane Verabreichung, die gegen Versuchsende vorgenommen wurde, erbrachte keinerlei Reaktion im immunologischen Verhalten aller Versuchstiere; dagegen stellten sich auf eine i.v. Antigengabe von 400 µg nach einmonatiger Pause wieder höhere Antikörperwerte ein (Abb. Nr. 9).

4.2.2.2 Nachweis der Antikörper nach aerogener Immunisierung

Der Zeitpunkt des Auftretens erster positiver Antikörperreaktionen war bei Kaninchen Nr. 7 und 9 bereits der 31. Versuchstag; die dabei erhaltenen relativen Proteinwerte, bezogen auf Anti-Enterotoxin B-Gammaglobulin, lagen dagegen wesentlich höher, im Gegensatz zu denen, die durch den MANCINI ermittelt wurden (35 bzw. 14 mg Protein/ml Serum). Der Proteingehalt der Sera lag während des gesamten Immunisierungszeitraumes bei mehr als 15 mg/ml. Nach dreimaliger Boosterung mit je 800 µg Toxin am 42. - 44.Versuchstag erreichten die ermittelten Bezugswerte aller Tiere Werte zwischen 26 und 30 mg Protein/ml Serum.
Eine zweimalige Immunisierung mit insgesamt 2400 µg Enterotoxin B am 93. und 94. Versuchstag führte zu einem deutlichen Rückgang (16 - 20 mg/ml) des Antikörpergehaltes, dem nach dreiwöchiger Pause ein Anstieg auf vorherige Werte als Antwort auf eine zweimalige Boosterung mit je 1600 µg folgte.
Bei Kaninchen Nr. 7 wurde am 99., bei Kaninchen Nr. 9 am 112., 145., 169. Versuchstag aus Krankheitsgründen kein Blut abgenommen.

Abb. Nr. 9 : Im ELISA nachgewiesene Antikörper nach parenteraler und aerogener Immunisierung, bezogen auf den Proteingehalt mg/ml Referenzserum



Die durch die aerogene Immunisierung im ELISA ermittelten Antikörperwerte lagen im gleichen, teilweise sogar höheren Bereich, als die durch parenterale Immunisierung erzielten (Abb. Nr. 9).

4.2.3 RIA

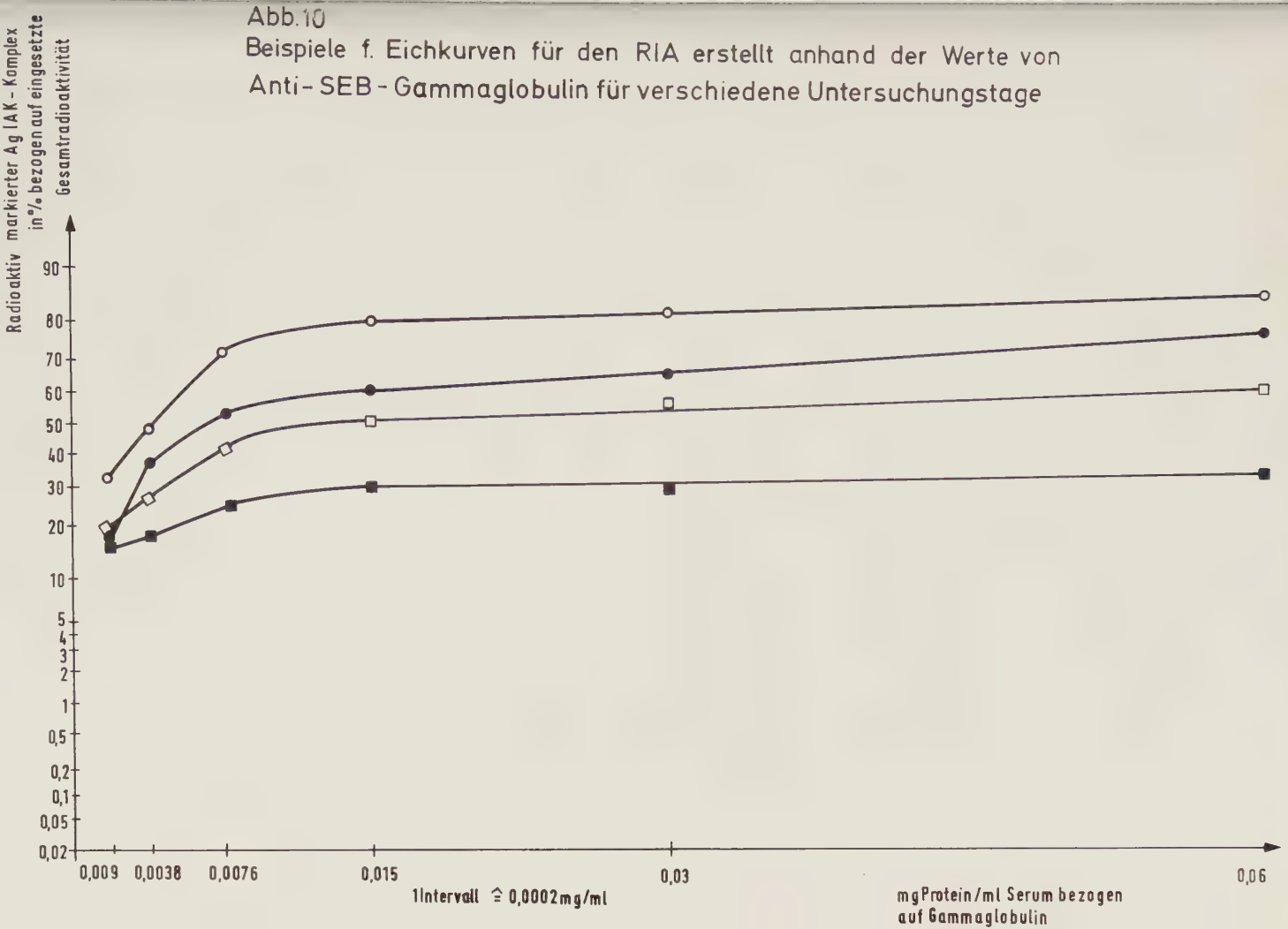
Für jeden der Versuchstage wurde eine eigene Eichkurve erstellt. Verwendet wurde der prozentuale Anteil radioaktiv markierten Antigen-Anti-Enterotoxin B-Gammaglobulinkomplexes in Relation zur eingesetzten Gesamtaktivität (Abb. Nr. 10).

4.2.3.1 Beurteilung der Antikörper nach parenteraler Immunisierung

Ein meßbarer Antikörpergehalt war bei diesem Nachweisverfahren erst nach der dritten Immunisierung bei nur einem Kaninchen feststellbar.
Nach der dritten Boosterung waren die Ergebnisse bei einem zweiten Versuchstier positiv; der absolute Antikörpergehalt zeigte bei dem RIA, bis nach der zweiten i.v. Applikation keinen signifikanten Anstieg. Ab der dritten i.v. Verabreichung stellte sich bei allen Tieren eine Aufwärtstendenz im Antikörpergehalt ein; die positive Nachweisgrenze lag dann bei einer Serumverdünnung von 1 : 8000. Bei einer weiterhin zunehmenden i.v. Antigendosis zeigten je 2 Tiere eine konträre Immunreaktion. Bei zwei Tieren fiel der Titer langsam ab, während bei den beiden anderen die Aufwärtstendenz anhielt; eines dieser beiden Tiere hielt den erreichten Antikörpergehalt nahezu bis zum Versuchsende, während der des anderen Tieres stark abfiel und nach einer längeren Immunisierungspause den Antikörpergehalt vor der Pause wieder erreichte (Abb. Nr. 11).

Abb.10

Beispiele f. Eichkurven für den RIA erstellt anhand der Werte von Anti-SEB-Gammaglobulin für verschiedene Untersuchungstage



4.2.3.2 Beurteilung der Antikörperwerte nach aerogener Immunisierung

Auch bei diesem Verfahren waren die ersten Antikörper bei Kaninchen Nr. 7 erst am 31. Versuchstag nachweisbar. Die später in den Versuch mit einbezogenen Tiere Nr. 9 und 10 zeigten keine bessere,aber schnellere Antikörperbildung. Das beste Ergebnis wurde bei allen drei Tieren nach zweimaliger Inhalation von je 1600 µg Enterotoxin B erzielt. Eine Erhöhung der Inhalationsdosis führte zu keinem weiteren Antikörperanstieg (Abb. Nr. 11).

Zur vergleichenden Gegenüberstellung der drei Nachweisverfahren wurden die ermittelten Antikörperwerte nach parenteraler Immunisierung von Kaninchen Nr. 4 graphisch dargestellt (Abb. Nr. 12).

Für den Vergleich der Antikörperwerte nach aerogener Immunisierung, die bei den drei Nachweismethoden festgestellt wurden, wurden die Ergebnisse aller am Versuch beteiligten Kaninchen dargestellt (Abb. Nr. 13).

Abb. Nr. 11 : Im RIA nachgewiesene Antikörper nach parenteraler und aerogener Immunisierung, bezogen auf den Proteingehalt mg/ml Anti-Enterotoxin B-Gammaglobulin

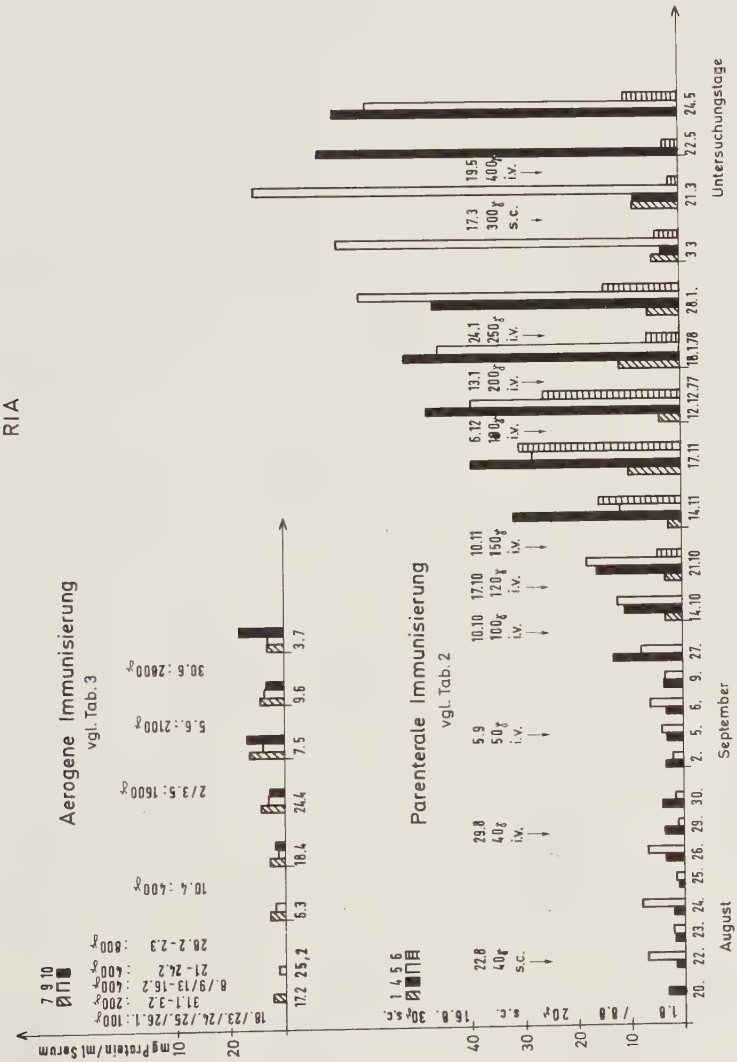


Abb. Nr. 12 : Vergleichende Darstellung der drei angewendeten Nachweisverfahren für gebildete Antikörper nach parenteraler Immunisierung bei Kaninchen Nr. 4
neg. = negativ

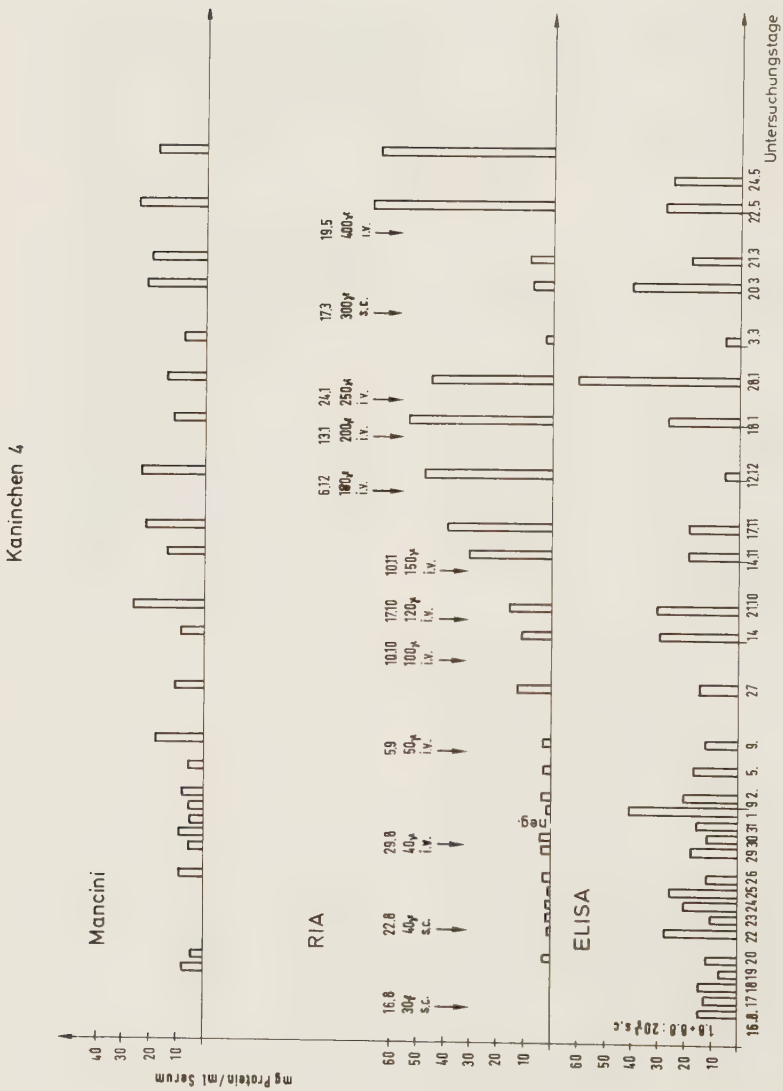
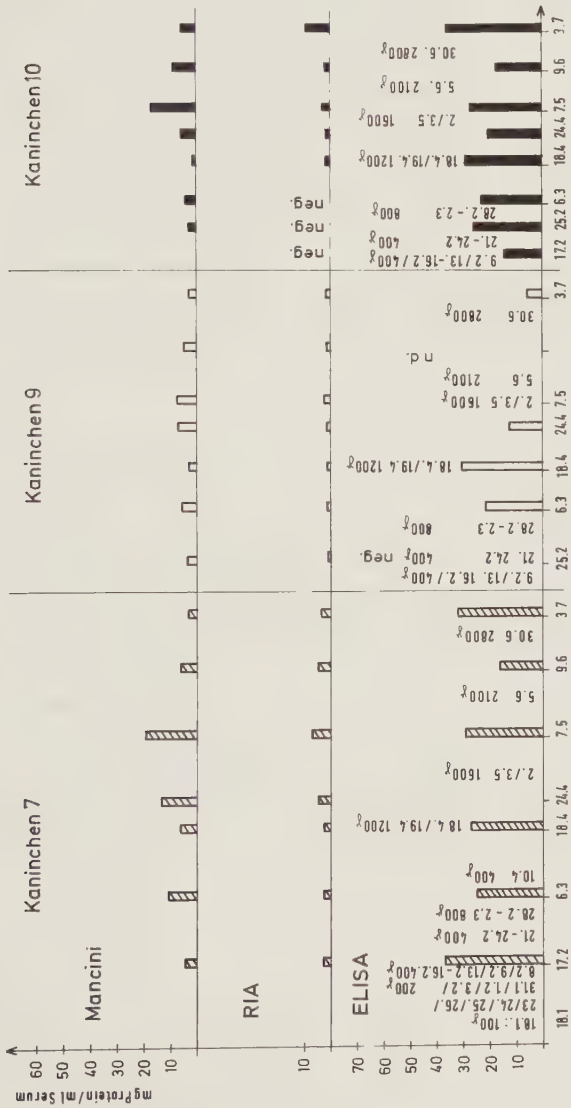


Abb. Nr. 13 : Vergleichende Darstellung der drei angewendeten Nachweisverfahren für gebildete Antikörper nach aerogener Immunisierung bei Kaninchen Nr. 7, 9, 10
n.d. = nicht durchgeführt
neg. = negativ



5. Diskussion

Die Überlegung, durch aerogene Antigenverabreichung eine Immunantwort auszulösen, wurde bereits 1935 von TRILLAT (70) angestellt. Es gelang ihm, Hühner gegen Hühnercholera zu immunisieren; im Laufe der Zeit wurden verschiedene Erregerarten - Bakterien, Viren, Pilze - als Aerosol eingesetzt und im Tierversuch erprobt. Praktisch wird die Aerosolimmunisierung bereits in der Tiermedizin angewendet. ACKERMANN (1) berichtet über die routinemäßige Aerosolimpfung der Nerze gegen Staupe, PRICE et al. (56) schreiben über die Anwendung dieses Verfahrens bei der Newcastle-Disease Schutzimpfung der Hühner, und von CHARISOV et al. (11) liegt eine Publikation über aerogene Immunisierung gegen Rinderbrucellose vor.
Spezielle Versuche werden zeigen, inwieweit diese Art der Immunisierung in der Humanmedizin angewendet werden kann.
Das größte Problem liegt darin, daß starke individuelle Schwankungen in der Aufnahme dieser Darreichungsform bestehen. Wie unter 2.3.2.3 beschrieben, beeinflussen Atemfrequenz und Atemminutenvolumen als persönliche Faktoren die Inhalationsmenge. Dazu kommen technische Probleme, die eine einheitliche Antigenmenge pro Individuum de facto nicht bestimmen lassen. Bei den oben angeführten angewandten Immunisierungen wurde meist in Aerosolkammern oder abgeschlossenen Behältnissen gearbeitet. In der Versuchsdurchführung dieser Arbeit wurde getestet, ob es möglich ist, eine individuelle aerogene Immunisierung durchzuführen.

Da die Versuchstierpopulation relativ klein war, konnte die Durchführung ohne allzu großen zeitlichen und materialintensiven Aufwand vorgenommen werden, was den Vorteil hatte, daß für jedes Tier eine definierte Ausgangsdosis eingesetzt werden konnte und somit die Voraussetzungen für jedes Kaninchen gleich waren. Es wurde hier die Reaktion der Kaninchen auf n a t i v e s Toxin, das bei beiden Applikationsarten eingesetzt wurde, untersucht.
Bei einem extrem hohen Toxingehalt,bis zu 2800 µg/ml Inhalationsflüssigkeit pro Tier,war ein niedrigerer Antikörpergehalt im Serum im Vergleich zu Ergebnissen nach parenteraler Immunisierung feststellbar. Die retinierte Aerosolmenge konnte nur theoretisch nachvollzogen werden.
Gemäß der Formel von GUYTON (29), ist eine Berechnung möglich (vgl. 2.3.2.3); danach werden von einer eingesetzten Dosis von 400 µg nur 21,5 µg vom Kaninchen während der zehnminütigen Expositionszeit inhaliert, davon werden lt. SELIVANOV et al. (65) wiederum nur 18 - 27 % retiniert, woraus eine effektive Dosis von ca. 4,8 µg pro Versuchstier resultiert. Bei einem Einsatz von 2800 µg pro Kaninchen haben nur 34 µg die Möglichkeit, immunogen wirksam zu werden.
Das Verhältnis zwischen Materialeinsatz und effektiver Antigenmenge beträgt ungefähr 85 : 1 und ist somit für eine wirtschaftliche Durchführung mit Sicherheit uninteressant. Es bliebe zu untersuchen, inwieweit eine zusätzliche parenterale Adjuvansverabreichung zu einer Reduzierung der eingesetzten Antigenmenge bei gleicher oder nach Möglichkeit höherer Antikörperproduktion führt.

Als Vergleichsgröße für die in allen drei Verfahren erhaltenen Werte wurde der Proteingehalt/ml Serum des Kaninchen Anti-Enterotoxin B-Gammaglobulins herangezogen (siehe unter 4.2.1).

Im vorliegenden Falle traten die ersten im 'MANCINI-Test' nachweisbaren präzipitierenden Antikörper einen Monat nach aerogenem Immunsierungsbeginn auf, am 32. Versuchstag (vgl. Tab. 3, 3.2.1.2).
Bis zu diesem Zeitpunkt wurden 16 Inhalationen mit insgesamt 3700 µg Enterotoxin B vorgenommen; die davon retinierte Menge betrug ca. 46 µg.

Im Vergleich dazu traten bei s.c. Immunisierung, unter Zugabe von inkomplettem Freund'schen Adjuvans, die ersten präzipitierenden Antikörper 18 Tage nach der Grundimmunisierung mit zwischenzeitlichen Enterotoxin B-Injektionen von insgesamt 70 µg auf.

Das erste Niveau der Antikörpertiter beider Immunisierungsarten zeigte keine gravierenden Divergenzen (Abb. Nr. 7). Vier weitere aerogene Boosterungen vom 27. - 30. Versuchstag mit insgesamt 1600 µg (D_{eff}= 19,48 µg)* führten zu einem leichten Titeranstieg, der durch weitere Antigenverabreichungen von 2400 µg (D_{eff}= 29,22 µg) forciert wurde. Nach einmonatiger Pause sank der Antikörpergehalt nach einer Dosis von 400 µg (entsprechend D_{eff}= 4,87 µg) am 85. Versuchstag. Diese Erscheinung dürfte durch das Auftreten der 'negativen Phase' erklärt werden können: vermutlich wurde die relativ geringe Antigenmenge durch zirkulierende Antikörper neutralisiert noch bevor sie wirksam werden konnte (32).
Eine zweimalige Boosterung mit je 1200 µg (D_{eff}= 29,22 µg) induzierte dagegen eine deutlich steigende Immunantwort.

* D_{eff} = effektive Dosis

Nach weiteren zwei Wochen wurden zweimal 1600 µg (D_{eff}= 38,4 µg) appliziert, die die Antitoxinbildung weiter positiv beeinflußten; der danach im Präzipitationstest erreichte Titer von 1 : 8, mit relativem Proteingehalt von 18 mg/ml Serum, wurde durch zunehmende Antigendosen nicht überschritten; es folgte im Gegenteil ein Absinken der Antikörperkonzentrationen auf etwa die Hälfte dieses Wertes.

Im RIA war die gleiche Reaktion zu beobachten, nur lagen hier die relativen Proteinwerte bei 8 mg/ml, die nach steigenden Antigendosen auf 3-6 mg/ml absanken.
Im ELISA konnte dieses Verhalten nicht beobachtet werden. Hier sank der relative Proteingehalt von ca. 28 auf 18 mg/ml nach einer erhöhten Antigendosis, nach der letzten Inhalation mit 2800 µg stieg der relative Proteingehalt jedoch auf Werte von 43 - 46 mg/ml Serum.

Die Immunreaktion auf steigende Antigenkonzentrationen war bei parenteraler Applikation ähnlich der aerogenen. Auch hier führte eine Steigerung des Toxingehaltes pro Applikation zu keiner höheren Antikörperproduktion.
Eine Beziehung beider Antikörpertiter nach parenteraler und aerogener Immunisierung ließ sich nur solange erstellen, als s.c. appliziert wurde, da hier der Antikörpergehalt bei beiden Immunisierungsmethoden in etwa gleich war. Erst der Übergang zur i.v. Verabreichung hatte eine signifikante Erhöhung präzipitierender Antikörper zur Folge. Mit einer Dosis von 50 µg i.v. wurde ein Titer von 1 : 8 erreicht, der auch mit 3200 µg (D_{eff}= 38,4 µg), aerogen verabreicht, erzielt wurde.

Zwei signifikant höhere Werte dürften, da bei zwei verschiedenen Tieren an verschiedenen Tagen auftretend, auf einen Untersuchungsfehler zurückzuführen sein. Eine gegen Versuchsende durchgeführte s.c. Applikation wurde vorgenommen, um Mutmaßungen zu entkräften, die dieser Applikationsart, im Gegensatz zur i.v., eine bessere Immunogenität zusprechen (32).

Durch den RIA sollten höhere Antikörperwerte ermittelt werden können, da nicht nur präzipitierende Antikörper erfaßt werden; diese Erwartung erfüllte sich allerdings nur partiell. Während der s.c. Applikationsperiode lagen die hierbei gemessenen relativen Proteinwerte in der Größenordnung der durch 'MANCINI' festgestellten.
Hierzu muß bemerkt werden, daß die Verdünnungsstufen um den Faktor 10^3 höher lagen, so daß anhand des Titers kein Vergleich erstellt werden kann.
Nach der zweiten i.v. Boosterung stieg die Nachweisgrenze von bisher maximal 1 : 2000 auf maximal 1 : 8000 an, was einem ungefähren Proteingehalt von 15 mg/ml Serum, bezogen auf den Proteingehalt des Anti-Enterotoxin B-Gammaglobulins, entsprach. Von diesem Zeitpunkt stieg der Antikörpergehalt bei allen vier Kaninchen im nahezu gleichen Verhältnis an und erreichte bei zwei Kaninchen mit der Antigendosis von 180 µg/ml sein Maximum mit 6 bzw. 14 mg Protein/ml Serum, während er bei zwei anderen Tieren weiter anstieg und eine relativ hohe Proteinkonzentration von über 65 mg/ml erreichte.

Die vorletzte Impfung, s.c. verabreicht, brachte auch hier keinen Erfolg und führte nur bei einem Tier zu stärkerer Antikörperproduktion mit einem Titer von 1 : 16000.
Eine letzte i.v. Antigendosis von 400 µg führte zu keiner besseren Immunantwort in Bezug auf die nach der Applikation von 190 µg erreichten.

Die Anwendung des RIA für den Nachweis der aerogen erzeugten Antikörper ergab durchweg niedrigere Relativwerte, als der 'MANCINI'. Die Nachweisgrenze lag nur in einem Falle bei 1 : 2000 und die Proteinwerte insgesamt unter 10 mg/ml. Die Tendenz der Immunantwort stellte sich bei diesem Nachweisverfahren so dar, wie sie im Präzipitationstest zu erkennen war: ein langsamer Anstieg des Antikörpertiters, mit seinem Maximum nach einer zweimaligen Gabe von 1600 µg Enterotoxin B und ihrem anschließenden Absinken.

Im ELISA, dessen Verdünnungsstufen um 10^2 höher lagen, als im 'MANCINI', und um 10^1 niedriger, als im RIA, wurden höhere Relativwerte erzielt als durch die beiden vorher beschriebenen Nachweisverfahren. Die nach <u>subkutaner Immunisierung</u> auftretenden Antikörper konnten hier 2 - 3 Tage früher nachgewiesen werden als im RIA oder 'MANCINI'; die im ELISA erzielten Werte betrugen nahezu das dreifache der durch die anderen Tests ermittelten Ergebnisse. Diese Werte sanken vor der ersten i.v. Applikation ab und erreichten danach wieder vorherige Werte, die bis auf einen Extremwert beibehalten wurden.

Bei diesem Nachweis wurde auf eine i.v. 400 µg-Dosis ein besseres, insgesamt einheitlicheres Ergebnis erzielt als bei den Vergleichsuntersuchungen.
In Relation zur Immunogenität niedrigerer Antigenkonzentrationen war dagegen keine wesentliche Verbesserung feststellbar.
Die Abnahme des Antikörpergehaltes nach der dritten i.v. Boosterung ist wahrscheinlich nicht auf das Auftreten der 'negativen Phase' zurückzuführen, da sich bei den Vergleichsuntersuchungen dafür keinerlei Hinweise ergeben haben, wodurch ein Fehler in der Versuchsdurchführung naheliegend sein dürfte.
Die nach aerogener Immunisierung im ELISA nachweisbaren Antikörper traten nicht früher auf als bei den beiden anderen Tests,aber in wesentlich höherer Konzentration: die ermittelten relativen Proteinwerte lagen um den Faktor 3 höher als die bisher festgestellten.
Die gegen Mitte der Immunisierung erreichten Werte wurden durch höhere Antigengaben relativ wenig beeinflußt und zeigten nur nach Applikation von 2800 µg (D_{eff}= 34 µg) eine weitere Zunahme. Die Nachweisgrenze lag bei beiden Antikörpertitern, nach parenteraler und aerogener Immunisierung bei 1 : 800, vereinzelt auch bei 1 : 1600.

Vorteile, die sich durch die Modifikation des ELISA für Handhabung und Anwendung ergeben, werden noch kurz dargelegt.
Im ELISA war es möglich, durch die Anlagerung aller Reaktionspartner an die Polystyrolküvetten sämtliche Reaktionsschritte, inklusiv des Enzymnachweises, im gleichen Röhrchen ablaufen zu lassen; im Gegensatz zu den Arbeitsvorschriften, bei denen der nachzuweisende Enzym-Substrat-Komplex erst nach Umfüllen in Küvetten gemessen werden konnte. Durch Zugabe von Substratlösung in die Reaktionsküvette ist es möglich, das gebundene Enzym direkt, ohne Verlust zu bestimmen.

Durch die Beobachtung des Blutbildes, die allerdings nur bei parenteraler Immunisierung vorgenommen wurde, war es möglich, die Wirkung der Toxingabe unmittelbar zu verfolgen.
Die nach der Grundimmunisierung provozierte Leukozytose spricht für eine massive Intoxikation, und die sich anschließende Leukopenie ist Zeichen für ihre anhaltende Wirkung. Parallel dazu veränderte sich auch die zelluläre Zusammensetzung des Blutes. Das vermehrte Auftreten von Lymphozyten, die nicht weiter differenziert wurden, bestätigt obige Aussage ebenso, wie toxische Granulation und Vakuolenbildung.
Inwieweit der Verlust der Anfärbbarkeit der Leukozyten eine Folgeerscheinung der Intoxikation oder durch bestehende Anämie mitbedingt war, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht abgeklärt werden.
Adspektorisch manifestierte sich die Anämie an den farblosen Konjunktiven und Mundschleimhäuten, die durch die tägliche Blutentnahme verursacht worden sein könnte.

Die über vier Wochen täglich durchgeführte Blutentnahme belastete die Tiere sehr; neben adspektorischer Anämie, nahm die Anfärbbarkeit der Leukozyten ab, außerdem wurde eine Sternzellenhämosiderose festgestellt.
Aufgrund dieser Beobachtungen und der geringen Aussagekraft der Blutuntersuchung, bedingt durch die kleine Versuchstierpopulation, wurde zur Schonung der Tiere im Verlauf der aerogenen Immunisierung darauf verzichtet.

6. Zusammenfassung

Versuchstiere wurden mit nativem Staphylokokken-Enterotoxin B in steigender Konzentration parenteral (s.c. und i.v.) und aerogen immunisiert. Die maximal eingesetzte Dosis betrug bei parenteraler Immunisierung 400 µg und bei aerogener 2800 µg. Der Effekt beider Immunisierungsarten wurde durch den Nachweis spezifischer Antikörper in drei verschiedenen Nachweisverfahren gemessen. Dazu wurden der Radiale-Immun-Diffusionstest nach MANCINI, der ELISA und der RIA angewendet.
Um die Ergebnisse dieser Methoden miteinander vergleichen zu können, wurde aus Kaninchen Anti-Staphylokokken-Enterotoxin B-Serum Gammaglobulin ausgefällt, und der Proteingehalt in mg/ml Serum bestimmt. Dieser Wert wurde auf die einzelnen Verdünnungsstufen der Gammaglobulin-Lösung umgerechnet, die bei den drei Methoden eingesetzt worden sind. Anhand der somit erstellten Eichkurven konnte den Testsera ein korrespondierender Wert zugeordnet werden.
Im Falle der parenteralen Immunisierung wurden die ersten Antikörper im MANCINI-Test nach drei s.c. Injektionen von insgesamt 70 µg Toxin am 19. Versuchstag nachgewiesen. Der ermittelte Bezugswert lag bei maximal 6 mg/ml Serum. Die beste Immunantwort trat nach i.v. Verabreichung von 180 µg Enterotoxin B auf. Als Bezugswert wurden 42 mg Protein pro ml Serum ermittelt.

Im ELISA zeigten bereits die Sera des 17. Versuchstages eine positive Reaktion. Der Proteingehalt, bezogen auf die Werte der Gammaglobulin-Lösung, betrug maximal 13 mg/ml Serum. Die nach i.v. Immunisierung gewonnenen Sera zeigten bei dieser Nachweismethode keinen deutlich erhöhten Antikörpergehalt. Die Bezugswerte lagen für den gesamten Untersuchungszeitraum zwischen 15 und 25 mg Protein. Der RIA ergab erst am 20. Versuchstag eine positive Reaktion mit einem Wert von 3,5 mg, bezogen auf den Proteingehalt der spezifischen Gammaglobulin-Lösung. Nach i.v. Enterotoxin B-Applikation wurde bei diesem Verfahren ein deutlicher Anstieg des Antikörpergehaltes registriert, die Gammaglobulin spezifischen Proteinwerte lagen zum Teil über 25 mg.

Für die aerogene Immunisierung wurde eine hohe Antigenkonzentration eingesetzt, von der nur ca. 1 - 2 % immunogen wirksam geworden sind.

Bis zum ersten positiven Ergebnis im MANCINI waren 16 Inhalationen mit insgesamt 3700 µg Enterotoxin B - die davon retinierte Aerosolmenge wurde mit 45 µg errechnet - erforderlich, die erste positive Reaktion ergab einen Bezugswert von 5 mg Protein. Im späteren Versuchsverlauf traten die höchsten Werte, mit Bezugsgrößen zwischen 8 und 20 mg, nach zweimaliger Boosterung mit je 1600 µg Enterotoxin B auf - die davon retinierte Menge betrug 19 µg.
Im ELISA wurden die ersten positiven Reaktionen zur gleichen Zeit wie im MANCINI festgestellt. Allerdings konnten hier höhere Bezugswerte ermittelt werden. Die Werte lagen bei 14 bzw. 37 mg Protein/ml Serum, bezogen auf den Gehalt des Gammaglobulins, nach der ersten positiven Reaktion und während der folgenden Untersuchungen zwischen 20 bis 30 mg/ml.

Die im RIA ermittelten Bezugswerte lagen meist unter 5 mg Protein/ml Serum und damit unter denen durch den MANCINI oder ELISA erhaltenen.
Wie im MANCINI konnte auch im RIA ein Antikörperanstieg (Bezugswert: 4 - 7 mg Protein/ml Serum) als Antwort auf eine zweimalige Inhalation von je 1600 µg Enterotoxin B festgestellt werden.
Im RIA und MANCINI wurden als Antwort auf diese Immunisierungsart wesentlich niedrigere Antikörperwerte festgestellt als nach parenteraler. Die im ELISA ermittelten Werte lagen dagegen nach aerogener Immunisierung in der gleichen Größenordnung, wie die nach parenteraler.
Das quantitative und qualitative Blutbild wurde nach parenteraler Immunisierung vier Wochen lang beobachtet. Die Werte entsprachen denen eines Blutbildes, wie sie nach bakteriellen Infektionen auftreten. Ein Maximum der Leukozytenzahl stellte sich am 1. Tag p.vacc. ein und trat bei späteren Boosterungen nicht mehr auf.

7. Summary

In this test rabbits were immunized parenterally and aerogeneously by pure staphylococcal enterotoxin B in rising concentrations. The maximum dose applied amounted to 400 µg for parenteral and 2800 µg for aerogen immunization. The effect of both immunization methods was estimated by three different serological identifications: the radial-immundiffusion-assay MANCINI, the ELISA and RIA.
Searching for a method to compare the results of these methods gammaglobulin had been precipitated from rabbit anti-staphylococcal-enterotoxin B-serum and the total serum protein determined (mg/ml).
This value was converted to several gammaglobulin dilutions, used with the different methods. Based on the thus detected calibration curve a corresponding value was attributed to the above test-sera. In the case of parenteral immunization the first positive antibody reaction obtained with MANCINI appeared on the 19th experimental day after three s.c. injections, with a total of 70 µg enterotoxin B. The reference value detected was about 6 mg/ml serum.
The best immune response was due to an i.v. injection of 180 µg enterotoxin B, the reference value amounted 42 mg protein/ml serum.
By ELISA a positive reaction could be proved on the 17th experimental day. The result was 13 mg, based on the total serum protein of gammaglobulin.
After i.v. injection the amount of antibodies in sera was not significantly higher. During the whole test-period the reference values were between 15 and 25 mg protein.

By the RIA the first positive reaction was obtained on the 20th experimental day only, yielding 3.5 mg with respect to total serum protein of specific gammaglobulin. After applying enterotoxin B i.v. a clear rise of the antibody concentration was found with this test.
The reference value amounted to more than 25 mg.

For the aerosol immunization a large quantity of antigen is necessary, but only 1 - 2 % of this become immunogenic.

The first positive results were evaluated with MANCINI after 16 inhalations with 3700 µg enterotoxin B in total. The effective dose of this could only be calculated and amounted to 45 µg. The first positive result provided 5 mg protein based on gammaglobulin.

During the whole experimental period the best reaction was obtained after immunizing twice with 1600 µg enterotoxin B per inhalation, the calculated dose of this was about 19 µg. With MANCINI and ELISA the first positive results were detected at the same time but at higher reference values, yielding values of 14 - 37 mg/ml and 20 - 30 mg/ml during the whole experimental period.
Most of the reference values obtained by RIA were lower than 5 mg/ml. By means of this test an increase in antibodies (reference value: 4 - 7 mg/ml protein) could be verified as a response to two inhalations of 3200 µg in total.
The amount of these antibodies obtained by MANCINI or RIA was by far lower than in comparison to that obtained by ELISA. The results of ELISA after aerogeneous and parenteral immunization were of similar order.

The quantitative and qualitative blood-picture was watched for four weeks after parenteral immunization. The results were identical to those found after bacterial infections. A maximum number of leukocytes was established the first day after the first immunization and was not reached in later boosterings anymore.

8. Literaturverzeichnis

1. ACKERMANN, O. (1966)
   Bessere Immunisierungsmöglichkeiten bei Nerzen gegen Staupe
   Dtsch. Tierärztl. Wochenschrift 73, 11 - 14

2. ALENKO, B.M., BRAZNIKOV, I.A (1970)
   Erfahrungen mit der Aerosolvaccination von Küken gegen Pseudopest
   Verterinarija 6, 52 - 53

3. ANDRÉ, C. (1975)
   Influence of repeated local stimulation on the splenic response to mucosal and parenteral immunization
   in: Developments in Biological Standardization S. Karger, Basel 28, 237 - 245

4. ANOSOV, I., ISPOLATOVSKAJA, M.V. LARINA, I.A. (1970)
   Die Wirkung der C-Lecithinase von Cl. perfringens des Typ A auf das Blut und Knochenmark von Meerschweinchen
   Zh. Mikrobiologie, Epidemiologie, S.U., 117 - 122

5. BERGDOLL, M.S. (1956)
   The Chemistry of Staphylococcal Enterotoxin
   Ann. N.Y. Acad. Sci. 65, 139 - 143

6. BERGDOLL, M.S. (1970)
   Enterotoxins
   in: MONTIE, T.C., KADIS, S. und AJL, S.J.: Microbial Toxins. Vol. III.
   Academic Press, New York und London, 265 - 326

7. BERGDOLL, M.S., CHU, F.S., HUANG, J.J., ROWE, C. und SHIH, T. (1965)
   Staphylococcal enterotoxin B. III. The physico-chemical properties and the N- and C-terminal amino acid sequences
   Arch. Biochem. Biophys. 112, 104 - 110

8. BOLOTOVSKIJ, V.M. (1959)

Die theoret. Voraussetzungen für die Arbeit der Aerosolkammer IVK-1 beim Studium von experimentellen Infektionen der Atmungsorgane

D.I.-Ivanovskij-Institut für Viruskunde, Moskau, UdSSR

9. BUCKLAND, F.E., HARPER, G.J., MORTAN, J.D. (1950)

Use of spores labelled with radiophosphorus in the study of the respiratory retention of aerosol

Nature, 166, 354 - 355

10. BURNET, F.M. (1959)

The clonal selection theorie of acquired immunity

Cambridge University Press

11. CHARISOV, S.CH., SACHAROVA, R.V., ABUZAROV, J.S. (1966)

Ein Aerosol-Immunisierungsverfahren gegen die Rinderbrucellose

Veterinarija, Moskva, 42, 37 - 39

12. COTEAU DE, W.E. (1974)

The role of secretory Ig A in defense of the distal lung

Ann. N.Y. Acad. Sci. 221, 214 - 219

13. DIMMICK, R.L. und AKERS, A.B. (1969)

An Introduction to Experimental Aerobiology

Wiley-Interscience, A Division of John Wiley and Sons, New York

14. DIRNAGL, K. (1973)

Technik der Aerosolerzeugung und Anwendung

First International Congress on Aerosols in Medicine, Baden/Wien 19. - 21. Sept. 1973, 57 - 63

15. DRUETT, A.A. (1967)

The inhalation and retention of particles in the human respiratory system

In: P.H. Gregory and J.L. Monteith, Airborne Microbes, Cambridge

16. DUNCAN, J.R. and THOMPSON, R.G. (1970)
Influence of immunization procedures on upper respiratory tract immunity in cattle
Canad. J. Comp. Med. 34, 94 - 100

17. ECKERT, H.G. (1976)
Die Technik des RIA
Angew. Chemie, 88, 565 - 573

18. EKINS, R.P. (1960)
The estimation of thyroxine in human plasma by an electrophoretic technique
Clin. Chem. Acta 5, 453

19. ENGVALL, PERLMANN (1971)
Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Quantitative assay of immunglobulin G.
Immunochemistry 8, 871 - 874

20. FELLENBERG, R.V. (1978)
Kompendium der allg. Immunologie
Paul Parey Verlag, Berlin/Hamburg

21. FEY, H.
Arbeitsanleitung zur Herstellung von Gammaglobulin für die Fluoreszenztechnik
Arbeitsblatt aus dem vet.-bakt. Institut der Universität Bern

22. FEY, H., STIFLER-ROSENBERG, G. (1977)
Messung von Tetanus-Antitoxinen beim Pferd mit dem 'Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay' (ELISA)
Schweiz. Archiv, Tierheilkunde 119, 437 - 446

23. FEY, H., STIFLER-ROSENBERG, G. (1977)
Messung von Tetanus-Antitoxin mit dem Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)
Schweiz. Medizinische Wochenschrift 107, 1101 - 1104

24. FEY, H. (1978)
Staphylokokken-Enterotoxine in Lebensmitteln und deren Nachweis
Chemische Rundschau 31, 6 - 9

25. FOURNIER J.-M. (1969)

L'immunisation par aérosols d'anatoxines tétanique et diphtérique lyophilisées (application à la vaccination du singe cynocéphale)

Thèse de Doctorat en Médicine, Lyon

26. FOURNIER J.-M. (1975)

L'immunisation collective par aérosols d'antigènes lyophilisés.
Technologie, résultats, étude des mécanismes fondamentaux d'acquisition de l'immunité.

Centre de Recherches du Service de Santé des Armées, Division de Microbiologie, Lyon

27. GADOL, N., JOHNSON, J.E., WALDMANN, R.H. (1974)

Respiratory tract cell-mediated immunity: Comparison of primary and secondary response

Infect. Immun., 9, 858 - 862

28. GALLILY, R., FELDMANN, M. (1967)

The role of macrophages in the induction of antibody in x-irradiated animals

Immunology, 12, 197

29. GUYTON, A.C. (1947)

Measurements of respiratory volume of laboratory animal

Amer. J. Physiol., 150, 70 - 77

30. HATCH, M.T. (1961)

Distribution and deposition of inhaled particles in respiratory tract

Bact.Rev., 25, 237 - 240

31. HATCH, M.T. und GROSS, P., (1964)

Pulmonary deposition and retention of inhaled aerosols

Academic Press, Inc., New York

32. HAWKER, L.E., LINTON, A.H., FOLKES, F.B., CARLIDE, M.J. (1962)

Einführung in die Biologie der Mikroorganismen

Georg Thieme Verlag, Stuttgart

33. HUNTER, W.M. (1973)
Radioimmunoassay
In: Weir,D.M., Handbook of Experimental Immunology
2nd edition,
Blackwell Scientific Publications, Oxford, 17, 1 - 36

34. JEMSKY, J.V. and PHILLIPS, G.B. (1965)
Aerosol-challenge of animals
In: Gay, W.J., Methods of animal experimentation,
N.Y. London Acad. Press, 2

35. JERNE, N.K. (1968)
In: 'Waiting for the end' Cold Spring Harbour
Symp. Quant. Biol., 32, 591

36. KALTREIDER, H.B. und SALMON, S.E. (1973)
Immunology of the lower respiratory tract:
Functional properties of bronchoalveolar
lymphocytes obtained from the normal canine lung
J. Clin. Invest., 52, 2211 - 2217

37. KAMMERMANN-LUESCHER, B. (1974)
Die Interpretation des weißen Blutbildes beim
Hund (1)
Tierärztl. Praxis, 2, 215 - 219

38. KAMMERMANN-LUESCHER, B. (1974)
Die Interpretation des weißen Blutbildes beim
Hund (2)
Tierärztl. Praxis, 3, 307 - 319

39. KARELSE, M.P. (1970)
Der Mechanismus der respiratorischen Immunisierung
Vet. Med. Dissertation der Universität Utrecht

40. KASS, E.H., GREEN, G.M., GOLDSTEIN, E. (1966)
Mechanism of antibacterial action in the
respiratory system
Bact. Revue, 30, 488 - 496

41. KOWNATZKI, E. (1976)
Humorale Immunreaktion
In: Vorlaender, K.-O., Praxis der Immunologie
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 8 - 15

42. KRAFT, H. (1964)
Labormethoden der Veterinärmedizin bei Haussäugetieren
Leik-Druck GmbH, Kelheim, 2. Auflage

43. LAURELL, C.-B. (1965)
Antigen-antibody crossed electrophoresis
Anal. Biochemie, 10, 358

44. LECLERCQ, PH. (1971)
Études chez la souris du pouvoir adjuvant d'une endotoxine bacterienne au cours de la vaccination par aérosols d'anatoxine tétanique lyophilisée
Thèse Doctorat en Pharmacie, Université de Lyon

45. LOO, J. van de (1960)
Über die Lokalisation der Antikörperbildung nach aerogener Immunisierung
Virchow's Arch. Path. Anat., 333, 40 - 53

46. MANCINI, G., CARBONARA, A.O. (1965)
Immunochemical Quantitation of Antigens by single Radial Immunodiffusion
Immunochemistry, 2, 235 - 254

47. MINOR, T.E. and MARTH, E.H. (1976)
Staphylococci and their significance in foods
Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam - Oxford - New York

48. MITCHELL, R.F. (1960)
Retention of aerosol particles in the respiratory tract, a review
Amer. Rev. Resp. Dis. 82, 627 - 639

49. NORTH, R.J. (1968)
The uptake of particulate antigens
J. Ret. Endoth. Soc., 2, 203

50. OAKLEY, C.L., FULTHORPE, A.J. (1953)
Antigenic analysis by diffusion
J. Path. Bact., 65, 49

51. OUDIN, J. (1951)
Methods
Med. Res., 5, 335

52. OTTE, H-J. (1967)
Leitfaden der Medizinischen Mikrobiologie
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

53. OUCHTERLONY, Ö. (1958)
Diffusion in gel methods for immunological analysis
Progress in Allergy, 5, 1 - 78

54. PETZOLD, K., BENTEN, Ch., FLOER, W. (1975)
Einsatz und Grenzen der aerogenen Massenimmunisierung gegen bakterielle Infektionskrankheiten unter Feldverhältnissen
Literaturstudie aus dem Inst. f. Mikrobiol. u. Tierseuchen der Tierärztl. Hochschule Hannover

55. PICKROTH, G. (1963)
Ultraschall- und Düsenaerosole in der Medizin
VEB-Verlag Gustav Fischer, Jena

56. PRICE, R.J., BOTTORFF, C.A., SEEGER, K., SYLSTRA, A.W., MARKHAM, F.S. (1955)
Vaccination against Newcastle-Disease and infectious bronchitis.II Field trials in mass vaccination with live virus dust vaccines
Poultry Science 34, 449 - 455

57. PÜTTER, J. (1970)
Peroxydasen
In: Bergmeyer, U., Methoden der enzymatischen Analyse
Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße, I, 648 - 654

58. RESCH, K. (1976)
Zelluläre Immunreaktionen
In: Vorlaender, K.-O., Praxis der Immunologie
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 59 - 71

59. REYNOLDS, H.Y., und THOMSON, R.E. (1973)
Pulmonary host defenses, I and II
J. Immunol., 111, 358 - 380

60. ROLLE, M., MAYR, A. (1966)
Mikrobiologie und allgemeine Seuchenlehre
Ferd. Enke Verlag, Stuttgart

61. ROSSEN, R.D. (1975)
The anamnestic response of the secretory immune system. A review
In: Developements in biological standardization
S. Karger, Basel, 28, 224 - 236

62. SCHEUNERT, A., TRAUTMANN, A. (1965)
Lehrbuch der Veterinärphysiologie
Paul Parey Verlag, Berlin

63. SCHEFFLER, R. (1974)
Vergleichende Untersuchungen zum Nachweis von Coxiella burnetii in Aerosolen durch das Impinger- und Gelatinefilterverfahren
Vet.-med. Dissertation, Giessen

64. SCHMIDT, H. (1957)
Serologische Grundlagen (Ag-Ak Bindung)
In: Hansen, K., Allergie
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 44 - 60

65. SELIVANOV, A.V., ELISEEVA, F.V., KHASANOV, CH.G. (1975)
Retention und Verteilung von Aerosol-Vakzinen in den Lungen von Haustieren (russ.)
Dokl. ises. Akad. sel.-Khos. Nauk 1, 28 - 29

66. SOMMERFELD, P., TERPLAN, G. (1974)
Methoden zum Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxin
Archiv für Lebensmittelhygiene, 26, 128 - 137

67. STEFFEN, C. (1968)
Allgemeine und experimentelle Immunologie und Immunpathologie
Georg Thieme Verlag, Stuttgart

68. STUCKRAD, J.v. (1979)
Unveröffentlichte Versuche zur Modifikation des RIA

69. TOMASI, TH.B. (1975)
Persönl. Mitteilungen an Dr. Chr.v.Benten, Hannover

70. TRILLAIT, A. (1935)
Essais de vaccination contre le choléra des poules
C.R. Hebd. Acad. Sci. (Paris), 201, 1065 - 1066

71. UHLENBRUCK, G. (1971)
Immunbiologie, eine Einführung
Goldmann-Verlag, München

72. UHR, J.W., WEISSMANN, G. (1965)
Intracellular distribution and degradation of bacteriophage in mammallian tissues
J. Immunol., 94, 544

73. ULRICH, R., BODART, F. (1947)
Blutkörperchensenkung, Koagulationsband und Blutbild
Urban und Schwarzenbeck Verlag, Wien

74. VAN HOUT, JOHNSON (1972)
Syntheses of rat Ig E by aerosol immunization
J. Immun. 108, 834 - 836

75. WALDMANN, R.H., GANGULY, R. (1974)
Immunity to infections on secretory surfaces
J. Infect. Diss., 130, 419 - 440

76. WALDMANN, R.H., GANGULY, R. (1975)
Duration of circulating and secretory antibody and cell-mediated immunity following immunization
In: Developments in biological standardization, S. Karger, Basel, 28, 275 - 284

77. WALDMANN, R.H., GANGULY, R. (1971)
Cell-mediated immunity and antibody responses in the respiratory tract after local and systemic immunization
J. Exp. Med., 134, 428 - 494

78. WIGAND, R. (1965)

Serologische Reaktionen bei Virus- und Rickettsieninfektionen

In: Haas, R., Vivell, O., Virus-, Rickettsieninfektionen des Menschen
J.F. Lehmann Verlag, München

79. WILLIAMS, R.C. and GIBBONS, R.J. (1972)

Inhibition of bacterial adherance by secretory IgA: A mechanism of antigen disposal

Science 177, 697 - 699

80. Anonym (1976)

The ELISA

Bull. WHO-CH 54, 129 - 139

81. KIMBLE, C.E. and ANDERSON, A.W. (1973)

Rapid sensitive assay for staphylococcal enterotoxin A by traversed immunoosmophoresis

Appl. Microbiology 25, 693

82. ALEXANDROV N.J., GEFEN N.E., BIDAK, A.P., EGOROVA, N.B., KRASNOVA,T.N., TSYLMLYNIY, G.T. (1968)

Étude comparative de la localisation des antigènes des bacilles de la typhoïde et de la dysentérie selon la méthode d'administration sous-cutanée ou par aérosol

Zh.Mikrobiol. Epidemio.Immunobiol., 39, 31 - 36

Abschließend danke ich Herrn Prof. Dr. G. Terplan für die Überlassung des Themas und seine Unterstützung bei der Ausführung meiner Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. W. Ahrens und Herrn Dr. J. von Stuckrad für ihre Hilfsbereitschaft und fachliche Unterstützung zur Fertigstellung meiner Arbeit.

Ebenso danke ich Frau Dr. E. Simon für die Durchsicht der Arbeit und allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des 'Mikrobiologischen Labors' der Sanitätsakademie, die durch ihre Hilfestellung zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.

Lebenslauf

Am 8. Juni 1951 wurde ich, Therese Einöder, geb. Straube, als zweites Kind des Karl Straube und seiner Ehefrau Thea in Regensburg geboren.

Von September 1957 bis 1961 besuchte ich die Augusten-Volksschule in Regensburg. Im September 1961 trat ich in das neusprachliche 'von-Müller'-Gymnasium in Regensburg über, wo ich im Juni 1971 das Abitur ablegte.

Im Oktober 1971 begann ich mit dem Studium der Biologie an der Universität Heidelberg.
Im Wintersemester 1972/73 nahm ich das Studium der Tiermedizin an der Freien Universität Berlin auf. Nach bestandenem Physikum wechselte ich zum Sommersemester 1974 an die Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität, München, an der ich im Mai 1977 das Studium mit dem 3. Teil des Staatsexamens erfolgreich beendete. Im Juli 1977 erhielt ich die Approbation als Tierärztin.

Seit Juli 1977 bin ich als wissenschaftliche Mitarbeiterin des Lehrstuhls für Hygiene und Technologie der Milch der Universität München an der Sanitätsakademie der Bundeswehr in München tätig.